



**Mariana Mendes Pinto Caraterização dos polissacarídeos da levedura
cervejeira excedentária**



**Mariana Mendes Pinto Caraterização dos polissacarídeos da levedura
cervejeira excedentária**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia Alimentar, realizada sob a orientação científica do Doutor Manuel António Coimbra, Professor Associado com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e da Doutora Elisabete Coelho, Bolseira de Pós-Doutoramento do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Dedico este trabalho aos meus pais.

o júri

presidente

Prof. Doutora Ivonne Delgadillo

professora associada com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva

professor associado com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutora Elisabete Verde Martins Coelho

bolseira de pós-doutoramento do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Mestre Tiago Monteiro Brandão

manager de Inovação e Desenvolvimento, Unicer Bebidas, SA

agradecimentos

Agradeço aos meus orientadores Professor Doutor Manuel António Coimbra e Doutora Elisabete Coelho por toda a motivação e acompanhamento e disponibilidade reveladas durante todo o trabalho, assim como por todos os conhecimentos transmitidos ao longo do meu percurso académico.

À empresa Unicer Bebidas, SA pelo fornecimento da levedura cervejeira excedentária utilizada neste trabalho e em particular ao Professor Tiago Brandão.

À Doutora Alexandra Nunes pela disponibilidade demonstrada e pela ajuda na análise quimiométrica dos resultados do FTIR.

À Unidade de Química Orgânica, Produtos Naturais e Agro-Alimentares (QOPNA) pela disponibilização de todo o equipamento laboratorial usado neste trabalho e em particular a todas as pessoas dos laboratórios de Bioquímica Alimentar pela ajuda prestada em todos os momentos, pelo companheirismo e apoio, com um especial agradecimento à Angélica Rocha, pela ajuda, principalmente na fase inicial do trabalho e pelo apoio que me deu. A todos os meus amigos que sempre estiveram presentes e me deram força e motivação.

Aos meus pais, agradeço todo o apoio, compreensão e carinho sempre manifestados e toda a confiança que sempre depositaram em mim.

Obrigada a todos os que de alguma forma me ajudaram a crescer quer pessoal como profissionalmente e que contribuíram para completar mais uma etapa na minha vida.

palavras-chave

Saccharomyces pastorianus, glucanas, manoproteínas, extração sequencial, hidrólise ácida parcial, análise das ligações glicosídicas

resumo

Nos últimos tempos, o interesse científico e económico na valorização de subprodutos tem vindo a ocupar um lugar de destaque. A levedura excedentária constitui o segundo maior subproduto da indústria cervejeira, sendo obtidas entre 1,7-2,3 kg de levedura excedentária/1000 L de cerveja produzida. As suas potencialidades não são devidamente aproveitadas, nomeadamente as que podem resultar dos polissacarídeos que fazem parte da sua constituição. De forma a ter uma visão abrangente dos polissacarídeos da levedura excedentária da indústria cervejeira, foi efetuada uma extração sequencial com água quente e soluções alcalinas de 0,1 M a 8 M de KOH. A extração com água quente solubilizou 17 % de carboidratos e as soluções alcalinas de 0,1 M a 1 M solubilizaram apenas 3-5 %. Por sua vez, as extrações com soluções alcalinas fortes permitiram solubilizar uma quantidade mais elevada, nomeadamente, 7 % com 4 M KOH e 18 % com 8 M KOH. Na extração com 4 M KOH os polissacarídeos extraídos são principalmente manoproteínas (85 %) e 13 % de glucanas, enquanto na extração com 8 M KOH os polissacarídeos extraídos são 65 % de manoproteínas e 35 % de glucanas. O resíduo final continha ainda 34 % de glucanas da amostra inicial sendo composto por 98 % de glucose. Com o intuito de promover a solubilização das glucanas insolúveis foram efetuados dois tratamentos distintos ao resíduo final: um tratamento de oxidação com clorito e uma hidrólise ácida parcial. A oxidação com clorito permitiu solubilizar material não polisacárido obtendo um resíduo rico em glucose. A partir da hidrólise ácida parcial foi possível obter glucanas solúveis em água com pesos moleculares \geq 40 kDa e duas frações com um peso molecular entre 2,4 e 40 kDa. No resíduo final as principais ligações glicosídicas encontradas foram Glc-(1 \rightarrow 4), seguida de Glc-(1 \rightarrow 3), Glc-(1 \rightarrow 4,6), terminal-Glc, Glc-(1 \rightarrow 6) e Glc-(1 \rightarrow 3,6), com uma percentagem molar de 57, 17, 10, 9, 4 e 2 %, respetivamente. Esta análise das ligações glicosídicas permitiu verificar que o resíduo final era rico em ligações de Glc-(1 \rightarrow 4). A diminuição da percentagem de ligações de Glc-(1 \rightarrow 4) por tratamento com celulase mostrou a presença de ligações de glucose β -(1 \rightarrow 4). No entanto, como a diminuição de ligações de Glc-(1 \rightarrow 4) também se verificou com o tratamento com α -amilase, é possível inferir a presença das configurações anoméricas α e β . A presença de bandas de absorção nos espetros de FTIR a 870-840 cm^{-1} e 890 cm^{-1} , característicos das configurações anoméricas α e β , respetivamente, confirmaram os resultados dos ensaios enzimáticos. Este trabalho permitiu verificar que os polissacarídeos mais abundantes da levedura excedentária cervejeira são polímeros com características estruturais semelhantes à celulose, justificando assim a sua resistência à extração com soluções alcalinas, à hidrólise ácida parcial e à oxidação com clorito, assim como a sua insolubilidade em soluções aquosas. Para a sua extração propõe-se a utilização sequencial de uma base forte, como por exemplo KOH, seguida da utilização de ácidos diluídos a quente.

keywords

Saccharomyces pastorianus, glucans, mannoproteins, sequential extraction, partial acid hydrolysis, glycosidic linkages

abstract

In the past few years, the interest in scientific and economic valuation of by-products has come to occupy a prominent position. Spent brewer's yeast is the second largest by-product of the brewing industry with 1.7 to 2.3 kg of surplus yeast/1000 L of produced beer. Its potentialities are not properly exploited, in particular those that may result from the polysaccharides that are part of its constitution. In order to have a whole picture of the polysaccharides of spent brewer's yeast, a sequential extraction with hot water and alkaline solutions of 0.1 M to 8 M KOH was performed.

The extraction with hot water solubilized 17 % of carbohydrates and the alkaline extractions with 0.1 M to 1 M solubilized only 3-5 % of carbohydrates. On the other hand, the extractions with stronger alkaline solutions allowed the solubilization of a greater amount, namely 7 % with 4 M KOH and 18% with 8 M KOH. The polysaccharides in the 4 M KOH extract were mannoproteins (85%) and 13 % of glucans, whereas the polysaccharides in the extraction with 8 M KOH were 65 % of mannoproteins and 35 % of glucans. The final residue still accounted for 34 % of the initial glucans and contained 98 % of glucose. The final residue was submitted to different treatments: an oxidation with chlorite and partial acid hydrolysis in order to promote the solubilization of insoluble glucans. The oxidation with chlorite allowed the solubilization of non-polysaccharide material and a residue rich in glucose was obtained. From partial acid hydrolysis it was possible to obtain glucans soluble in water with molecular weight ≥ 40 kDa and two fractions having a molecular weight between 2.4 and 40 kDa.

The main glycosidic linkages found in the final residue were (1 \rightarrow 4)-Glc followed by (1 \rightarrow 3)-Glc (1 \rightarrow 4,6)-Glc terminally-linked Glc, (1 \rightarrow 6)-Glc and (1 \rightarrow 3,6)-Glc with 57, 17, 10, 9, 4 and 2 mol %, respectively. This analysis showed that the final residue was rich in (1 \rightarrow 4)-linked Glc. The decrease on the molar percentage of (1 \rightarrow 4)-Glc by treatment with cellulase showed the presence of β -(1 \rightarrow 4)-Glc. However, by treatment with α -amylase it was also observed a decrease in the (1 \rightarrow 4)-Glc linkages, allowing to infer the presence of the two α and β anomeric configurations. The presence of FTIR spectra absorption bands in the 870-840 cm^{-1} and 890 cm^{-1} , characteristic of α and β anomeric configurations, respectively, confirmed the results of enzymatic assays. This work has shown that the most abundant polysaccharides in spent brewer's yeast are polymers that seem to contain structural features similar to cellulose, thus justifying its resistance to extraction with alkaline solutions, to partial acid hydrolysis and chlorite oxidation, as well as their insolubility in aqueous solutions.

For extraction of these polysaccharides is proposed a sequential utilization of a strong base, such as KOH, followed by using of hot diluted acids.

Índice Geral

Índice Geral	iii
Índice de Tabelas	vii
Índice de Figuras	ix
Lista de Abreviaturas	xi
1.Introdução teórica	1
1.1 A levedura da indústria cervejeira	3
1.1.1 Posicionamento da indústria cervejeira mundialmente	3
1.1.2 Leveduras do género <i>Saccharomyces</i> - agente fermentativo e subproduto da indústria cervejeira	4
1.2 Valorização da levedura excedentária da indústria cervejeira.....	6
1.3 Parede celular da levedura cervejeira	8
1.4 Polissacarídeos da levedura cervejeira	11
1.4.1 Glucanas	11
1.4.1.1 Caraterísticas estruturais e físico-químicas	11
1.4.1.2 Atividades biológicas das β -glucanas	15
1.4.2 Manoproteínas	18
1.4.2.1 Caraterísticas estruturais e físico-químicas	18
1.4.2.2 Atividades biológicas.....	21
1.5 Métodos de extração dos polissacarídeos da levedura cervejeira.....	21
1.6 Âmbito do Trabalho	25
2. Material e métodos	27
2.1. Amostra	29
2.2 Determinação da percentagem de humidade e percentagem de sólidos totais	29
2.3 Determinação da proteína solúvel total pelo método do ácido bicinconínico (BCA) ...	30
2.4 Extração sequencial dos polissacarídeos da levedura cervejeira excedentária	31

Índice Geral

Índice Geral	iii
Índice de Tabelas	vii
Índice de Figuras	ix
Lista de Abreviaturas	xi
1.Introdução teórica	1
1.1 A levedura da indústria cervejeira	3
1.1.1 Posicionamento da indústria cervejeira mundialmente	3
1.1.2 Leveduras do género <i>Saccharomyces</i> - agente fermentativo e subproduto da indústria cervejeira	4
1.2 Valorização da levedura excedentária da indústria cervejeira.....	6
1.3 Parede celular da levedura cervejeira	8
1.4 Polissacarídeos da levedura cervejeira	11
1.4.1 Glucanas	11
1.4.1.1 Caraterísticas estruturais e físico-químicas	11
1.4.1.2 Atividades biológicas das β -glucanas	15
1.4.2 Manoproteínas	18
1.4.2.1 Caraterísticas estruturais e físico-químicas	18
1.4.2.2 Atividades biológicas.....	21
1.5 Métodos de extração dos polissacarídeos da levedura cervejeira.....	21
1.6 Âmbito do Trabalho	25
2. Material e métodos	27
2.1. Amostra	29
2.2 Determinação da percentagem de humidade e percentagem de sólidos totais	29
2.3 Determinação da proteína solúvel total pelo método do ácido bicinconínico (BCA) ...	30
2.4 Extração sequencial dos polissacarídeos da levedura cervejeira excedentária	31

2.5 Tratamento do resíduo final (RF2) com clorito.....	34
2.5.1 Clorito / Hidróxido de potássio	34
2.5.2 Clorito / Ácido acético	36
2.6 Precipitação com etanol.....	37
2.7 Hidrólise Ácida Parcial.....	38
2.8 Cromatografia em Coluna	38
2.8.1 Cromatografia de Exclusão Molecular por Filtração em Bio-Gel P-30	38
2.9 Tratamento enzimático do resíduo final	39
2.10 Determinação de Carboidratos	40
2.10.1 Método Colorimétrico - Fenol/Ácido Sulfúrico	40
2.10.2 Método Colorimétrico para Determinação de Ácidos Urónicos	40
2.10.3 Análise de Açúcares Neutros	41
2.10.4 Análise das Ligações Glicosídicas por Metilação	42
2.11 Espectroscopia de Infravermelho com Transformadas de Fourier (FTIR).....	45
3. Resultados e discussão.....	47
3.1 Extração sequencial e precipitação com etanol	49
3.1.1 Tratamento com clorito	52
3.1.2 Análise das ligações glicosídicas	55
3.2 Hidrólise ácida parcial	57
3.2.1 Cromatografia de exclusão molecular em Bio-Gel P-30.....	58
3.2.2 Análise das Ligações Glicosídicas	60
3.3. Tratamento enzimático	62
3.4 Análise por Espectroscopia de Infravermelho - FTIR.....	66
3.5 Relação entre a estrutura dos polissacarídeos da levedura cervejeira excedentária e possíveis atividades biológicas.....	69
4. Conclusões e trabalho futuro	71

5. Referências bibliográficas	77
-------------------------------------	----

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Enumeração dos diversos subprodutos obtidos na produção anual de cerveja, malte e vinhos e respetiva quantificação (2007) [12]	7
Tabela 2 – Componentes maioritários da parede celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> [20, 21, 23, 25]	10
Tabela 3 – Quadro resumo da aplicação de métodos tradicionais para extração de polissacarídeos existentes na <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	24
Tabela 4 - Análise de carboidratos e rendimentos de extração da extração sequencial e precipitação com etanol	49
Tabela 5 - Análise de carboidratos e rendimentos de extração do tratamento com clorito ao resíduo final	53
Tabela 6 - Ligações glicosídicas de algumas frações da extração sequencial, Et 37,5% e resíduo tratado com clorito/KOH	55
Tabela 7 - Ligações glicosídicas dos diferentes ciclos da hidrólise ácida parcial e respetivas frações obtidas na cromatografia de exclusão molecular em Bio-Gel P-30	60
Tabela 8 - Ligações glicosídicas dos carboidratos presentes no resíduo final e no resíduo final tratado com celulase e α -amilase	63

Índice de Figuras

Figura 1 - Valor do mercado mundial cervejeiro entre 2009-2014 [1].	3
Figura 2 - Processo tecnológico de produção de cerveja, adaptado de [10].	6
Figura 3 - Quantidade de subprodutos obtida na produção de cervejas, maltes e vinhos (kg/1000 L)[12]	7
Figura 4 - Composição e estrutura da parede celular da levedura cervejeira, adaptado de [26]	10
Figura 5 - Representação esquemática das glucanas β -(1 \rightarrow 3) e as ligações estabelecidas com glucanas β -(1 \rightarrow 6) e a quitina. A verde estão representadas as ligações glicosídicas β -(1 \rightarrow 3), a laranja as ligações glicosídicas β -(1 \rightarrow 6) e a azul as ligações glicosídicas β -(1 \rightarrow 4) [31].	12
Figura 6 - Representação da cadeia de glucanas β -(1 \rightarrow 6) da parede celular de <i>S. cerevisiae</i> . Os círculos a branco correspondem a unidades de glucose unidas por ligações β -(1 \rightarrow 6); os círculos a preto correspondem a ramificações de monómeros de glucose em β -(1 \rightarrow 3,6); os círculos a cinzento correspondem a monómeros de glucose unidos por ligações β -(1 \rightarrow 3) [33]	12
Figura 7 - Representação da molécula de glicogénio e das respetivas ligações glicosídicas [39]	14
Figura 8 - Representação esquemática das ligações de manose da manoproteína [54]	19
Figura 9 - a) Estrutura da manoproteína de <i>S. cerevisiae</i> em ligação glicosídica do tipo <i>N</i> a um resíduo de asparagina; b) Estrutura da manoproteína de <i>S. cerevisiae</i> em ligação glicosídica do tipo <i>O</i> a um resíduo de serina ou treonina. M, manose; GN, N-acetilglucosamina; P-fosfato; Asn, asparagina; Ser, serina; Thr, treonina. [57]	20
Figura 10 - Representação esquemática dos métodos usados na extração de polissacarídeos.	22
Figura 11 - Representação esquemática das reações envolvidas no método do ácido bicinonínico para determinação da proteína solúvel total [74].	30
Figura 12 - Representação esquemática da extração sequencial dos polissacarídeos da levedura cervejeira excedentária	31
Figura 13 - Tratamento do RF2 da levedura excedentária com clorito/KOH.	34

Figura 14- Tratamento do RF2 da levedura excedentária com clorito/AcOH.....	36
Figura 15 - Cromatograma referente a cada um dos 7 ciclos de hidrólise ácida parcial. As letras de A a D e os correspondentes números associados dizem respeito a sub-frações dos ciclos de 1-7 da hidrólise ácida parcial; v_0 representa o volume morto e v_i o volume interno.....	59
Figura 16 - Espectros de FTIR obtidos das amostras: resíduo final (verde), resíduo final tratado com α -amilase (vermelho) e resíduo final tratado com celulase (azul).....	66
Figura 17 - Coordenadas fatoriais, PC1 vs. PC2, da região de FTIR 1200-600 cm^{-1}	67
Figura 18 - Contribuições fatoriais (“loadings”) de PC1 e PC2 da região de FTIR 1200-600 cm^{-1} . As setas a vermelho indicam picos correspondentes a números de onda caraterísticos de β -glucanas (tratamento com α -amilase) e as setas a azul são indicadores de números de onda caraterísticos de α -glucanas (tratamento com celulase).....	68

Lista de Abreviaturas

Abreviatura	Denominação
Ac.Ur.	ácido urónico
AcOH	ácido acético
Ara	arabinose
Asn	asparagina
ATR	célula de reflexão atenuada total
BSA	albumina do soro bovino
DMSO	dimetilsulfóxido
EtOH	etanol
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformadas de Fourier
Gal	galactose
GC	cromatografia em fase gasosa
GC-qMS	cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa com analisador quadrupolo
Glc	glucose
GRAS	“Generally Recognized as Safe”
kDa	kilodalton
Man	manose
mol %	Percentagem molar
PCA	análise dos componentes principais
pp.	precipitado
RF1	resíduo final obtido após a extração sequencial com a solução de 8 M de KOH
RF2	resíduo final obtido após a neutralização e diálise do RF1
Rib	ribose
rpm	rotações por minuto
Ser	serina
sn.	sobrenadante
Sn-Rf	sobrenadante do resíduo final obtido após a neutralização e diálise do RF1
T.amb.	temperatura ambiente
TFA	ácido trifluoroacético
Thr	treonina
Xyl	xilose

1.INTRODUÇÃO TEÓRICA

1.1 A LEVEDURA DA INDÚSTRIA CERVEJEIRA

1.1.1 Posicionamento da indústria cervejeira mundialmente

A indústria cervejeira mantém uma posição estratégica e dinâmica no sector agro-alimentar aliando a tradição de uma bebida com mais de 8000 anos ao desenvolvimento científico e tecnológico.

Esta apresenta um valor económico substancialmente significativo, estando em 2009 o mercado global cervejeiro avaliado em cerca de 550 mil milhões de dólares americanos, um aumento superior a 1,5 % relativamente ao ano anterior. Estima-se que entre 2009 e 2014 haja um crescimento exponencial, estando o mercado global cotado em cerca de 600 mil milhões de dólares americanos para 2014 (Figura1) [1].

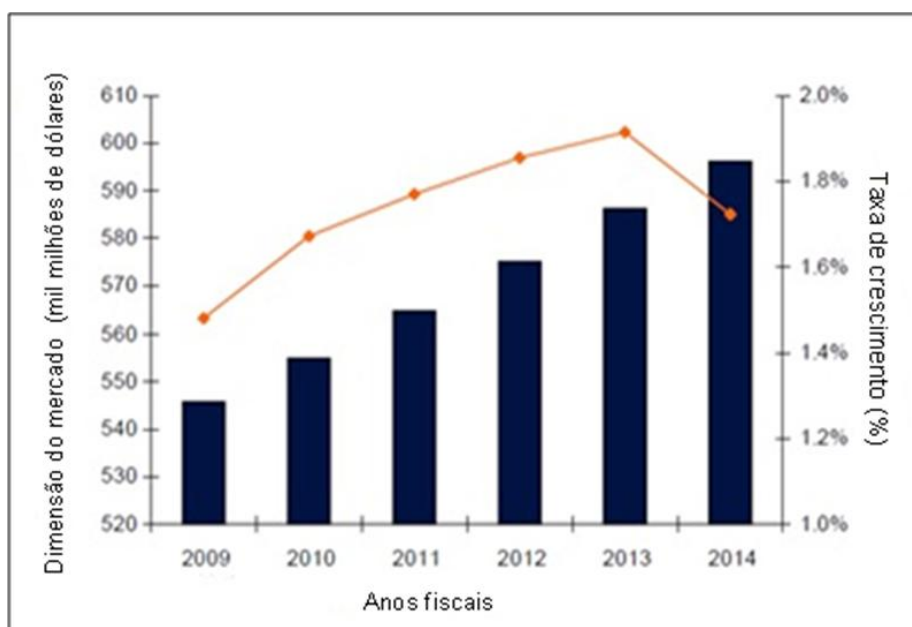


Figura 1 - Valor do mercado mundial cervejeiro entre 2009-2014. As barras azuis dizem respeito à dimensão do mercado e a linha vermelha corresponde à taxa de crescimento [1].

Em Portugal, o setor cervejeiro contribui de modo significativo para a economia do país, tendo um grande impacto a nível socioeconómico, promovendo não só o crescimento económico, bem como a empregabilidade, sendo que em 2009 o número de postos de trabalho, direta e indiretamente criados por esta indústria, correspondia a cerca de 72.900, gerando um total de 1.020 milhões de euros para a economia do país, na produção e venda desta bebida [2].

Em 2008, a Associação Portuguesa de Produtores de Cerveja (APCV) estima que foram produzidos um total de 8,2 milhões de hectolitros de cerveja e consumidos 6,2 milhões de hectolitros, sendo que o consumo *per capita* corresponde aproximadamente a 61 L [2].

1.1.2 Leveduras do género *Saccharomyces* - agente fermentativo e subproduto da indústria cervejeira

A cerveja é uma bebida obtida por fermentação alcoólica, na qual se utilizam leveduras do género *Saccharomyces*, mosto preparado a partir de malte de cereais, particularmente a cevada, e outras matérias-primas amiláceas ou açucaradas, lúpulo e água. A levedura, para além de ser responsável pela conversão dos açúcares em etanol e dióxido de carbono, tem um impacto fundamental na qualidade da cerveja uma vez que produz outros compostos tais como ácidos orgânicos, ésteres, aldeídos, cetonas e compostos sulfurosos, que apresentam um papel relevante no perfil sensorial da cerveja [3-5].

As leveduras usadas no processo fermentativo podem ser divididas em duas classes: “*Bottom fermenting*”, que representam as leveduras da espécie *Saccharomyces pastorianus* ou *Saccharomyces carlsbergensis*; estas fermentam a uma temperatura entre os 8 -15 °C, no qual a massa fica depositada no fundo do reator, na forma de flocos, dando origem à denominada cerveja *lager*, e a “*Top fermenting*” que correspondem à intitulada cerveja *ale*, produzida a partir de *Saccharomyces cerevisiae*, em que a fermentação ocorre a temperaturas entre os 16-25 °C [3, 6].

As leveduras “*Bottom fermenting*” têm um teor mais elevado em fosfatos, potássio e amónia na superfície celular e parecem ser menos hidrofóbicas e mais carregadas negativamente do que as leveduras “*Top-fermenting*”[7]. Esta diferença na hidrofobicidade pode explicar a diferença no comportamento destas estirpes no final da fermentação. Na “*top-fermenting*” os flocos associam-se às bolhas de CO₂ e sobem para o topo do fermentador, enquanto na “*bottom-fermenting*” os agregados que se formam ficam depositados no fundo do reator [7, 8].

A figura 2 representa o processo tecnológico de produção da cerveja *lager* no qual é possível observar que a levedura é introduzida na fase da fermentação, atuando apenas como um agente de transformação, não sendo parte integrante do produto final. Existem, no entanto, alguns tipos de cerveja como a *Weißbier* em que alguma levedura está presente

na formulação final. A produção de cerveja engloba processos físicos e reações químicas e bioquímicas. Os passos principais de produção incluem a maltagem, a moagem, a brassagem, a filtração do mosto, a ebulição do mosto, fermentação, maturação, estabilização e clarificação da cerveja [9, 10]. A maltagem provoca a libertação do material amiláceo e promove a diminuição do tamanho das moléculas de amido com o intuito de aumentar a sua área superficial e consequentemente incrementar a velocidade de hidrólise do amido na fase seguinte. A brassagem constitui um passo importante para a fase da fermentação, pois durante a brassagem ocorre a hidrólise das moléculas de amido, através da ação enzimática, dando origem a glucose, maltose e maltodextrinas que vão ser metabolizadas pelas leveduras do género *Saccharomyces* durante a fermentação alcoólica [4]. A filtração do mosto representa outro dos passos de produção permitindo separar do mosto o material insolúvel (dreche) constituído pelas cascas dos grãos de cevada, lípidos e proteínas. O passo seguinte baseia-se na ebulição do mosto filtrado promovendo-se a inibição da atividade enzimática e remoção de substâncias que podem afetar as características sensoriais da bebida, sendo também nesta fase que se adiciona o lúpulo. Na fermentação é adicionada a levedura que é responsável pela metabolização dos açúcares, produzindo etanol e dióxido de carbono. A levedura é reutilizada em 3 a 7 ciclos fermentativos, conforme a necessidade do processo produtivo. Após este período de reutilização, esta é recolhida por sedimentação natural, sendo então descartada uma vez que a sua capacidade fermentativa começa a ser pouco viável [3]. Estudos demonstram que após algumas utilizações da levedura esta começa a apresentar alterações metabólicas ao nível, por exemplo, da transcrição de determinados genes envolvidos na glicólise e na capacidade de conversão de açúcares, tornando a fermentação menos rentável ao longo dos ciclos de utilização. Além disso, verifica-se, igualmente, a repressão de genes envolvidos na resposta a fatores de stresse. A levedura deixa portanto de apresentar a mesma viabilidade a nível fermentativo e metabólico constituindo, assim, um subproduto da indústria cervejeira [11]. Após esta etapa, a cerveja passa pela fase de maturação promovendo-se a remoção de aromas indesejáveis produzidos pela levedura e, na fase final, o produto é submetido a duas etapas, estabilização e clarificação, que asseguram as características sensoriais pretendidas e a estabilidade do produto final [5].

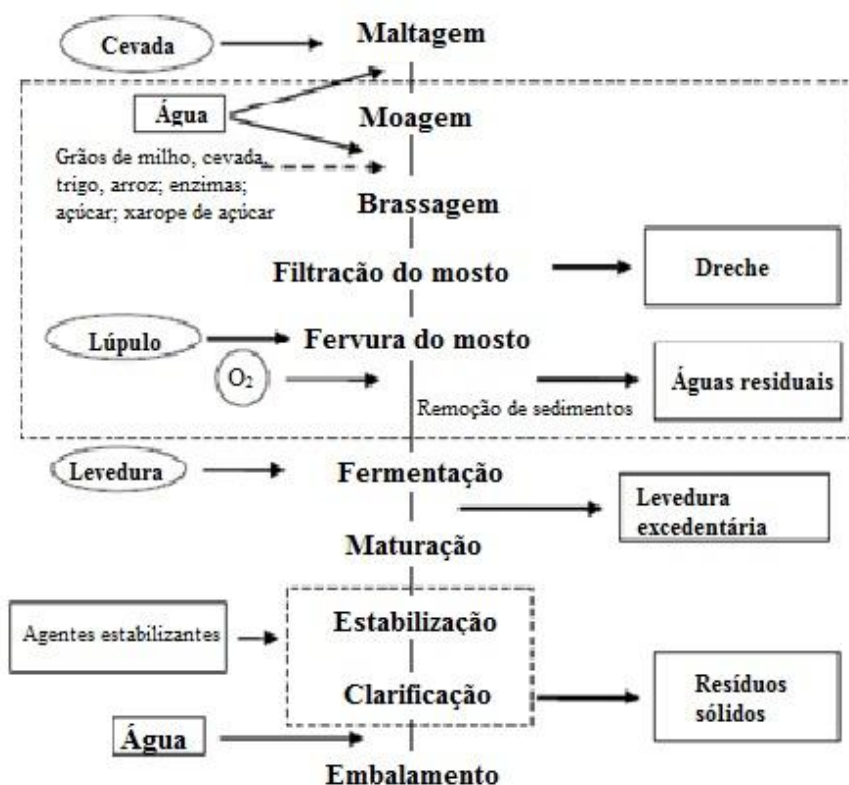


Figura 2 - Processo tecnológico de produção de cerveja, adaptado de [10]

1.2 VALORIZAÇÃO DA LEVEDURA EXCEDENTÁRIA DA INDÚSTRIA CERVEJEIRA

A valorização de subprodutos obtidos pela indústria assume, cada vez mais, um papel crucial no sector empresarial, pelo que é importante a investigação e conhecimento dessa matéria excedentária de modo a se desenvolverem novos produtos de valor acrescentado, que conduzam a um incremento no valor financeiro e económico das indústrias e a uma redução nos problemas associados às descargas de matéria orgânica produzida.

Segundo dados da Unicer Bebidas, SA, a maior empresa cervejeira do país, em 2007 grande parte dos subprodutos obtidos correspondiam à produção de cerveja, com valores a rondar os 141,1 kg de subprodutos/1000 L de cerveja produzida (Figura 3) [12]. É possível observar, pela tabela 1, que no caso da levedura excedentária, o segundo maior subproduto do processo de produção de cerveja, foram obtidas, aproximadamente, 5618t [12].

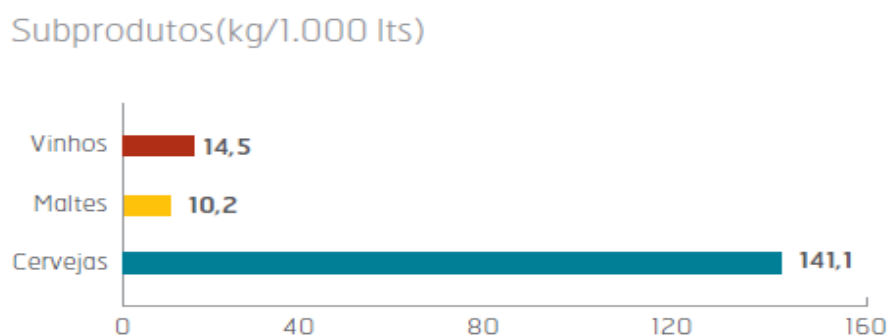


Figura 3 - Quantidade de subprodutos obtida na produção de cervejas, maltes e vinhos (kg/1000 L)[12]

Tabela 1 - Enumeração dos diversos subprodutos obtidos na produção anual de cerveja, malte e vinhos e respetiva quantificação (2007) [12]

Subprodutos	Destino	Quantidade (t)
Produção de Cervejas		
Dreche		57.296
Levedura excedentária		5.618
Produção de Malte		
Cevada de 2ª	Alimentação animal	1.630
Radículas de Malte		1.887
Unicer Vinhos		
Bagaço	Destilação	58
Borras e Lamas		30
Total		66.519

A alimentação animal tem sido um dos principais destinos deste subproduto, funcionando como uma fonte rica de proteína e de outros nutrientes (vitaminas como as do complexo B, minerais e ácidos nucleicos). Apesar disso, existem estudos, recentes, direcionados para a utilização das propriedades da levedura excedentária na promoção do crescimento de organismos em aquacultura e na resistência a algumas infeções bacterianas, como é o caso da *Streptococcus iniae*; no desenvolvimento de alimentos funcionais e no seu uso como promotores ou potenciadores de aromas em alimentos [3, 13].

A levedura cervejeira apresenta, igualmente, aplicações interessantes na área da saúde, visto que é uma boa fonte de crómio trivalente, crómio biologicamente ativo, conhecido como um fator de tolerância à glucose, que segundo estudos feitos *in vitro* potencia a atividade da insulina, podendo ser relevante no controlo da diabetes. [3, 14].

Os extratos obtidos a partir deste subproduto podem, também, ser usados como fonte de nutrientes para o crescimento e desenvolvimento microbiano e como agentes de biorremediação [3].

Apesar das inúmeras aplicações já citadas, a sua utilização acarreta algumas limitações devido à parede celular da levedura, que é rígida e resistente à atividade das enzimas digestivas, conduzindo a problemas de digestibilidade e ao facto da levedura

conter um teor elevado de ácidos nucleicos, principalmente ácido ribonucleico (RNA), o que pode levar à acumulação de ácido úrico, que pode cristalizar nos tecidos e órgãos, conduzindo à formação de cálculos renais e à deposição de cálcio nos tecidos moles [3].

Verifica-se, atualmente, um acréscimo na investigação dos componentes da levedura isoladamente, tais como enzimas, nucleótidos, polissacarídeos (manoproteínas e glucanas), bem como lípidos (fosfolípidos e ergosterol). Estes compostos isolados apresentam propriedades biológicas bastante interessantes, tendo aumentado o interesse no desenvolvimento e aperfeiçoamento de métodos de isolamento e caracterização dos constituintes da levedura, de modo a valorizar e rentabilizar da melhor forma possível este subproduto.

A parede celular, em particular, demonstrou ser bastante interessante ao nível da atividade biológica dos seus compostos e posterior aplicabilidade no desenvolvimento de novos produtos [15].

1.3 PAREDE CELULAR DA LEVEDURA CERVEJEIRA

A levedura cervejeira diz respeito, fundamentalmente, a duas espécies de levedura do género *Saccharomyces*: a *S. cerevisiae* e a *S. pastorianus* [16, 17]. A estrutura da parede celular destas duas espécies é similar, no entanto existem diferenças nas interações e a associação tridimensional das várias moléculas que constituem a parede, contribuindo, desta forma, para diferentes graus de hidrofobicidade, elasticidade e propriedades fermentativas [18].

Este trabalho, em concreto, centra-se no estudo da levedura cervejeira excedentária, neste caso a espécie *S. pastorianus*. O estudo é direcionado em particular para os polissacarídeos que fazem parte da sua constituição, no entanto a informação disponível sobre este assunto é inexistente.

Com base na informação genética, existem estudos que suportam a hipótese de que a *S. pastorianus* é um híbrido de *S. cerevisiae* e *S. bayanus*, uma vez que se verifica a coexistência de dois tipos de cromossomas de forma independente: um conjunto que tem origem a partir de *S. bayanus* e outro conjunto que resulta da *S. cerevisiae*. Como os estudos disponíveis sobre as características genotípicas de *S. pastorianus* se referem apenas à homologia intermédia que esta apresenta com a levedura *S. cerevisiae*, não estabelecendo

comparações com a *S. bayanus* nem existindo informações sobre os polissacarídeos da levedura *S. bayanus*, os dados disponíveis na literatura, e usados neste trabalho, relativos à parede celular e à sua composição dizem respeito à levedura da espécie *S. cerevisiae* [17, 19].

A parede celular de *S. cerevisiae* representa entre 15-30 % do peso seco e entre 25-50 % do volume da célula sendo responsável por 4 funções principais: a estabilização/equilíbrio da pressão osmótica da célula, prevenindo o influxo de água; a proteção contra o stresse físico e mecânico; a manutenção da forma da célula (morfologia celular) e a proteção contra o ataque de organismos estranhos (controle da permeabilidade) [20, 21].

A parede celular é composta, principalmente, por polissacarídeos correspondendo a cerca de 75 % do peso seco, 13 % de proteínas e 9 % de lípidos, sendo que cada fração exerce uma função importante na célula. As proteínas permitem às células flocularem, contribuindo deste modo para a formação de biofilmes, ajudam as células a fixar metais, como é o caso do ferro, facilitam a captação de esteróis e são necessárias para o crescimento em meios anaeróbicos. Estas proteínas podem afetar significativamente a hidrofobicidade das células, que é importante na adesão ao poliestireno e a outras superfícies abióticas, e na preparação de bebidas alcoólicas [20]. No que diz respeito aos lípidos das paredes celulares estes desempenham funções importantes na manutenção da estrutura membranar das células, na sinalização de vias metabólicas e na regulação de processos celulares vitais [13].

Os polissacarídeos da parede celular são divididos em 3 grupos de acordo com a sua estrutura: as β -glucanas, polímeros de glucose, nomeadamente glucanas β -(1 \rightarrow 3) e glucanas β -(1 \rightarrow 6), que constituem respetivamente 50 % e 10 % da massa seca da parede celular, as manoproteínas, que consistem em polímeros de manose ligados covalentemente a péptidos e correspondem, aproximadamente, a 35-40 % do peso seco da parede celular e a quitina, polímero de N-acetilglucosamina, que representa entre 1-3 % da massa seca da parede celular. (Tabela 2) [21, 22].

Apenas alguns artigos fazem referência à presença de α -glucanas com ligações α -(1 \rightarrow 4) e α -(1 \rightarrow 6) correspondentes ao glicogénio presente na parede celular e associado às glucanas através de ligações covalentes. A sua composição na parede celular é bastante variável, entre 1 % e 23 % [23-25].

Tabela 2 – Componentes maioritários da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* [20, 21, 23, 25]

Macromoléculas	Massa molecular média (kDa)	% Massa na parede celular	Grau de polimerização
Glucanas β (1 \rightarrow 3)	240	50	1500
Glucanas β (1 \rightarrow 6)	24	10	150
Manoproteínas	100-200	35-40	Altamente variável
Quitina	25	1-3	120
Glicogénio	-	1-23	-

A figura 4 é representativa da organização estrutural da parede celular da levedura cervejeira, na qual é possível verificar que na camada interna estão presentes as β - glucanas e quitina, sendo responsáveis pela força mecânica da parede e pelo estabelecimento dos locais de ligação das proteínas que constituem a camada externa. Por sua vez, a camada externa é composta por manoproteínas muito glicosiladas, estando envolvida em processos de reconhecimento celular, para além de contribuir para o controlo da permeabilidade da parede celular, protegendo a membrana plasmática do ataque de enzimas estranhas e outros compostos que possam, eventualmente, perturbar ou danificar a membrana das células [15]. As proteínas da parede celular estão ligadas à rede quitina – glucanas β -(1 \rightarrow 3) ou às glucanas β -(1 \rightarrow 6), através de ligações covalentes.

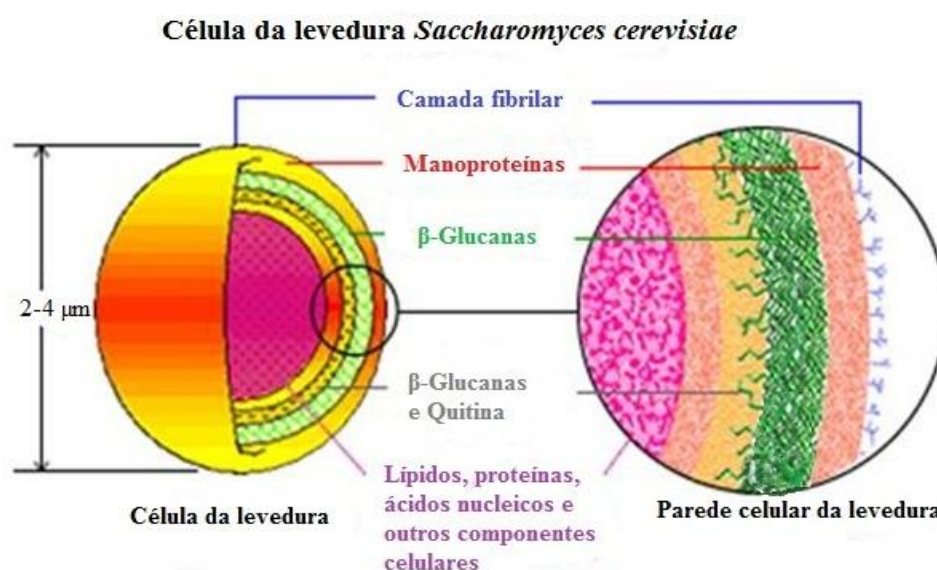


Figura 4 - Composição e estrutura da parede celular da levedura cervejeira, adaptado de [26]

1.4 POLISSACARÍDEOS DA LEVEDURA CERVEJEIRA

1.4.1 Glucanas

A parede celular da levedura *S. cerevisiae* é constituída maioritariamente por β -glucanas (55-65 %). As β -glucanas extraídas da levedura cervejeira excedentária apresentam uma elevada viscosidade, retenção de água, capacidade de ligação a óleos, apresentando uma vasta gama de possíveis aplicações industriais. Estes polissacarídeos podem ser usados na formulação de produtos cosméticos, na área farmacêutica e no setor alimentar, sendo usados como espessantes alimentares, substituintes de gordura, ou funcionando como fibra dietética. [20, 27, 28].

As α -glucanas com ligações α -(1 \rightarrow 4) e α -(1 \rightarrow 6) correspondem ao glicogénio um polissacarídeo de reserva que fornece a energia necessária às células para os processos metabólicos. O teor em glicogénio nas leveduras varia entre 1 % e 23 %, dependendo do meio nutricional das células, do método de isolamento, das condições ambientais, entre outras [23, 24].

1.4.1.1 Caraterísticas estruturais e físico-químicas

As β -glucanas de *S. cerevisiae* podem ser divididas em dois subtipos de acordo com as ligações glicosídicas que se estabelecem entre os monómeros de glucose e que se baseiam maioritariamente em glucanas β -(1 \rightarrow 3), constituídas por cadeias longas de cerca de 1500 resíduos de D-glucose unidos por ligações β -(1 \rightarrow 3) e uma pequena quantidade de glucanas β -(1 \rightarrow 6) que consistem em cadeias de 150 a 200 monómeros de D-glucose, unidos por ligações β -(1 \rightarrow 6) [20, 29, 30].

As glucanas β -(1 \rightarrow 3) da parede celular de *S. cerevisiae* são um polímero ramificado, com ligações a glucanas β -(1 \rightarrow 6). As glucanas β -(1 \rightarrow 3) podem estar covalentemente ligadas a outros componentes da parede celular, podendo-se ligar a resíduos de N-acetilglucosamina, através de ligações β -(1 \rightarrow 4) entre o terminal não-redutor da glucana e o terminal redutor da cadeia de quitina. As ligações entre as glucanas β -(1 \rightarrow 3) e β -(1 \rightarrow 6) permanecem ainda por caraterizar (Figura 5) [31, 32].

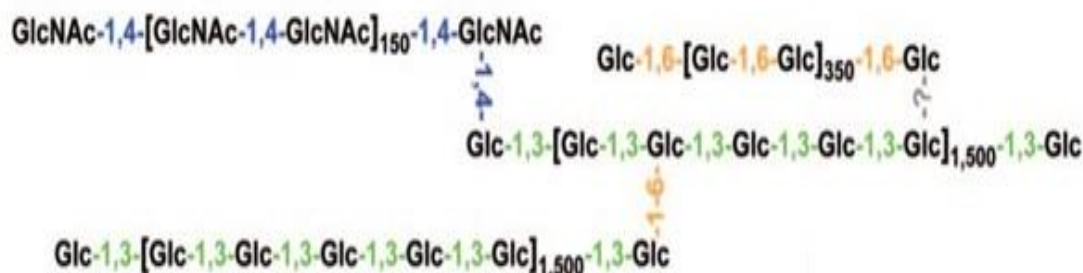


Figura 5 - Representação esquemática das glucanas β -(1 \rightarrow 3) e as ligações estabelecidas com glucanas β -(1 \rightarrow 6) e a quitina. A verde estão representadas as ligações glicosídicas β -(1 \rightarrow 3), a laranja as ligações glicosídicas β -(1 \rightarrow 6) e a azul as ligações glicosídicas β -(1 \rightarrow 4) [31]

A figura 6 ilustra um modelo da glucana β -(1 \rightarrow 6) da parede celular de *S. cerevisiae*, em que a cadeia principal é composta por resíduos de glucose em ligação β -(1 \rightarrow 6), podendo existir ramificações de resíduos únicos de glucose em ligação β -(1 \rightarrow 3), ocasionalmente verifica-se, também, ramificações de dissacarídeos em ligação β -(1 \rightarrow 3) [33].

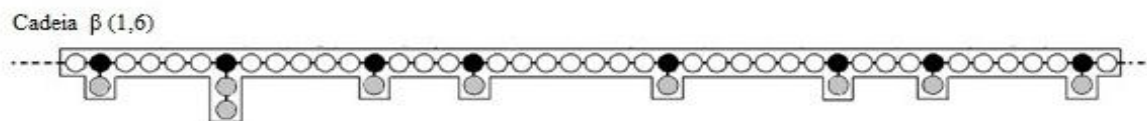


Figura 6 - Representação da cadeia de glucanas β -(1 \rightarrow 6) da parede celular de *S. cerevisiae*. Os círculos a branco correspondem a unidades de glucose unidas por ligações β -(1 \rightarrow 6); os círculos a preto correspondem a ramificações de monômeros de glucose em β -(1 \rightarrow 3,6); os círculos a cinza correspondem a monômeros de glucose unidos por ligações β -(1 \rightarrow 3) [33]

A síntese, regulação e propriedades das glucanas β -(1 \rightarrow 3) estão bem caracterizadas, ao contrário das glucanas β -(1 \rightarrow 6), cuja estrutura exata e mecanismo de biossíntese permanecem pouco elucidativos. No entanto, sabe-se que estas glucanas contribuem para a estabilização e rigidez da parede celular, uma vez que estabelece ligações entre os diferentes componentes da parede celular, que incluem as glucanas β -(1 \rightarrow 3), manoproteínas, quitina e glicogénio. Estas ligações são essenciais para a manutenção estrutural dos componentes, além de prevenir a dissolução de polissacarídeos solúveis em água [23, 33, 34].

A estrutura macromolecular das β -glucanas depende quer da fonte como do método de isolamento destes polímeros, variando principalmente na distribuição e no tamanho das cadeias laterais. A atividade biológica das β -glucanas depende de diversos parâmetros,

destacando-se a estrutura primária, solubilidade, grau de ramificação, peso molecular, bem como a carga dos seus polímeros e a sua conformação estrutural em meio aquoso [29, 30, 35]. Existe um grande interesse na caracterização da atividade biológica, peso molecular, grau de ramificação e conformação tridimensional das glucanas, pois o conhecimento destas propriedades pode conduzir ao estabelecimento de correlações entre estas características e possíveis atividades biológicas deste polissacarídeo.

Na literatura foram citadas três conformações possíveis que este polissacarídeo pode adotar, sendo elas a hélice tripla, a hélice simples e a conformação em forma de espiral aleatória. Apesar de reportadas estas conformações estruturais, permanece, ainda, pouco esclarecido qual a estrutura referente às glucanas com maior atividade biológica. No entanto, alguns estudos sugerem que as β -glucanas com uma conformação em hélice tripla apresentam maior bioatividade [30, 35-37].

O processamento dos alimentos pode afetar a estrutura molecular e o grau de polimerização, as interações moleculares e algumas propriedades funcionais como a viscosidade, capacidade de retenção da água e solubilidade, o que por sua vez pode interferir nas propriedades sensoriais e fisiológicas e consequentemente nos efeitos benéficos destes polissacarídeos [27]. Estas alterações podem ser devidas ao processamento mecânico e ao tratamento térmico excessivo aplicado nos produtos alimentares, sendo que as modificações estruturais desfavoráveis podem, também, ocorrer durante o processo de purificação, resultando numa diminuição do peso molecular e na redução da viscosidade.

A solubilidade das β -glucanas está relacionada com o grau de polimerização e, por conseguinte, com a sua organização física, sendo que para graus de polimerização superiores a 100, ou seja com uma massa molecular de 16 kDa, correspondem β -glucanas completamente insolúveis em água, podendo-se concluir que a solubilidade diminui à medida que o grau de polimerização aumenta [30]. De acordo com a sua solubilidade, as β -glucanas podem ser classificadas como: 1) glucanas β -(1 \rightarrow 3) alcalino-insolúveis, 2) glucanas β -(1 \rightarrow 3) alcalino-solúveis e 3) glucanas β -(1 \rightarrow 6) altamente ramificadas. As glucanas alcalino-solúveis correspondem a cerca de 15-20 % do total de glucanas presentes na parede celular, sendo constituídas por uma cadeia principal de elevado peso molecular (240-550 kDa), em ligações β -(1 \rightarrow 3), contendo 3-4% de ligações β -(1 \rightarrow 6) [15, 30].

A insolubilidade das glucanas é um fator limitante na aplicação destes polissacarídeos em testes experimentais, tendo sido já realizadas investigações relacionadas com a promoção de modificações bioquímicas das β -glucanas com o intuito de ultrapassar esta limitação, incrementando a sua solubilidade e fomentando, consequentemente, a aplicabilidade deste composto [30, 37, 38].

O grau de ramificação é outro fator que pode influenciar a bioatividade destes polissacarídeos, uma vez que a solubilidade das β -glucanas depende do grau de ramificação, sendo que as glucanas altamente ramificadas são solúveis em água, o que sugere que elevados graus de ramificação e solubilidade são parâmetros que contribuem para uma maior atividade no que concerne à ativação da resposta imunológica do hospedeiro [29].

As α -glucanas dizem respeito ao glicogénio e as ligações glicosídicas características deste polímero são resíduos de glucose em ligação α -(1 \rightarrow 4), com ramificações de glucose em α -(1 \rightarrow 4,6), como é possível visualizar na figura 7.

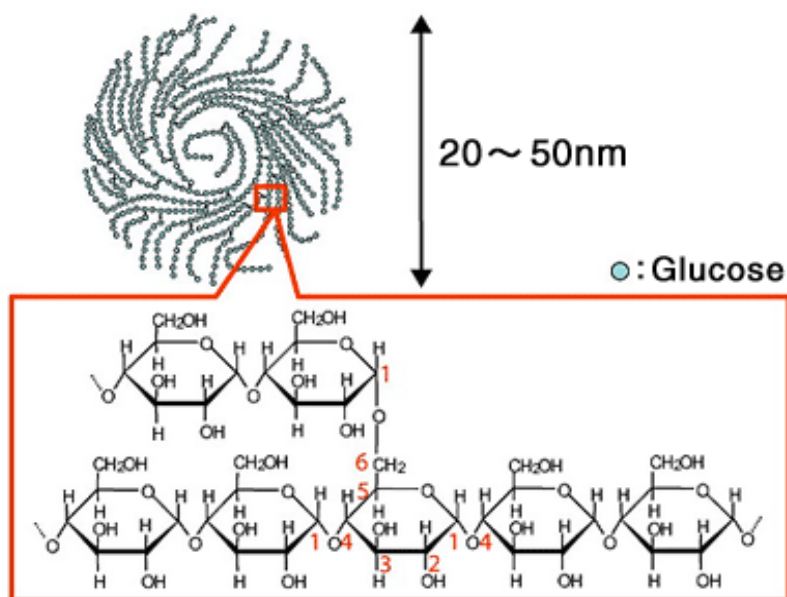


Figura 7 – Representação da molécula de glicogénio e das respetivas ligações glicosídicas [39]

Existem duas “pools” de glicogénio na levedura: uma solúvel, situada no citosol e outra insolúvel, ligada à parede celular [40]. A insolubilidade, neste caso, deve-se ao facto do glicogénio da parede celular estar ligado covalentemente a uma glucana β -(1 \rightarrow 3) através de uma ligação β -(1 \rightarrow 6) [23-25].

O glicogénio proveniente da levedura cervejeira *S. cerevisiae* contém aproximadamente 1000 monómeros de glucose, e as ramificações de Glc α -(1 \rightarrow 6) ocorrem a cada 11-12 resíduos de glucose [41, 42].

1.4.1.2 Atividades Biológicas das β -glucanas

- Atividade imunoestimuladora

Algumas das β -glucanas são responsáveis pela estimulação do sistema imunitário, conferindo proteção contra o ataque de possíveis agentes patogénicos, que podem ser tóxicos e carcinogénicos para o organismo. Estes polissacarídeos não são sintetizados pelo Homem, portanto estes compostos são reconhecidos como moléculas estranhas ao organismo, estimulando, deste modo, a atividade do sistema imunitário [29, 43].

Estudos recentes reconhecem a capacidade das β -glucanas na modulação do sistema imunitário de vários organismos vivos, desde insetos a humanos, através de interações específicas com diferentes células imunocompetentes [44]. As β -glucanas são responsáveis pela estimulação da atividade dos macrófagos e neutrófilos e pelo aumento da resistência a infeções por bactérias Gram-negativas, apresentam, igualmente, atividade antitumoral, antibacteriana, antioxidante e antimutagénica, além da sua capacidade para estimular a libertação de citocinas, a partir dos macrófagos [22, 30, 44]. Esta estimulação da atividade dos macrófagos, por parte destes compostos de *S. cerevisiae*, pode, conjuntamente, contribuir para a cicatrização e redução de cicatrizes após uma cirurgia ou acidente [29, 43]. As β -glucanas ativam a resposta do sistema imunitário através da ligação a locais específicos (recetores) nos monócitos/macrófagos e granulócitos, desencadeando uma cascata de eventos imunológicos, atuando como agentes imunoadjuvantes, antitumorais e radioprotetores [36, 44].

O *zymosan A* é um exemplo de uma preparação comercial insolúvel obtida a partir da parede celular de *S. cerevisiae*, composto por unidades repetidas de glucose unidas por ligações β -(1 \rightarrow 3) e que apresenta um papel importante na indução da resposta inflamatória, ativando os macrófagos a produzirem citocinas, substâncias imunomodulatórias locais que por sua vez ativam e estimulam a atividade das células do sistema imunitário. O *zymosan A* promove, igualmente, a resposta imune em indivíduos administrados com a vacina do vírus da imunodeficiência humana e a redução dos níveis de ácidos nucleicos virais nas células

de porcos infectados com o vírus da gripe suína, levando ao aumento das interferências gama e dos níveis de óxido nítrico [29, 37].

As β -glucanas não mostraram qualquer efeito ou dano genotóxico e/ou clastogénico, por isso este biopolímero pode tornar-se um importante adjuvante em tratamentos como é o caso da quimioterapia, enquanto tem a capacidade de reduzir os efeitos adversos dessas drogas [43].

A comunidade científica ainda se debate com os potenciais efeitos imunoestimulantes das β -glucanas, uma vez que existem algumas limitações no seu uso, tais como o tamanho da cadeia deste polímero, bem como a sua estrutura e organização molecular em soluções aquosas. Apesar destas aparentes limitações as glucanas β -(1 \rightarrow 3) são capazes de interagir com uma grande diversidade de polímeros, pequenas moléculas e mesmo recetores biológicos, desencadeando uma série de efeitos relacionados com a resposta imunitária [45].

Durante as duas últimas décadas, as glucanas β -(1 \rightarrow 3) têm sido aplicadas em novas terapias no tratamento do cancro, no tratamento e prevenção de infeções, no transporte de drogas e na recuperação após a exposição à radiação. No entanto existem algumas limitações relacionados com o desenvolvimento e estudo das glucanas que se prendem com a produção em larga escala com elevada reprodutibilidade e a sua caracterização, tendo sido já produzidas glucanas modificadas, através de métodos sintéticos, que permitem um conhecimento detalhado destes polímeros, sendo igualmente possível determinar/definir o comprimento mínimo da cadeia e o número de ramificações necessários para se obter uma atividade ótima, abrindo novas perspetivas e aplicações futuras em áreas como a saúde, entre outras [45-47].

- Controlo da hipercolesterolemia

As β -glucanas de leveduras são reconhecidas como produtos seguros para o consumidor (GRAS), sendo já usadas como aditivos alimentares em produtos como queijo, bolachas, gelados e molhos, como espessantes, em filmes edíveis, em rações alimentares e em produtos alimentares pouco calóricos [27, 48].

A ingestão de β -glucanas tem sido referida como sendo uma forma segura, eficiente e barata de redução do colesterol sanguíneo e dos níveis de gordura no organismo, aumentando a viscosidade intestinal e reduzindo a absorção do colesterol, favorecendo

assim a sua excreção. No entanto, existe pouca informação relativamente ao mecanismo de ação destes compostos no controlo da hipercolesterolemia. Esta redução da quantidade de lípidos e do colesterol total e LDL é um vínculo importante na prevenção de doenças crónicas, como a hipertensão arterial e a arteriosclerose [29, 43].

Algumas β -glucanas podem reduzir a concentração de açúcar no sangue após a sua ingestão, provavelmente por retardar o esvaziamento do estômago, fazendo com que a glucose seja absorvida mais gradualmente [27, 29, 43].

- Fibra dietética

As β -glucanas não são degradadas pelas enzimas do nosso organismo, podendo ser utilizadas como fibra dietética, apresentando assim um interessado nutricional e funcional, contribuindo para a promoção do crescimento de bactérias ácido-láticas do género *Lactobacillus* e Bifidobactérias, microrganismos que colonizam o trato intestinal e que desempenham um papel importante na saúde do hospedeiro. [27]

- Atividade antimicrobiana

Na bibliografia está, igualmente, reportado que as β - glucanas de *S. cerevisiae* estão envolvidas no tratamento de infeções bacterianas, como é o caso de estirpes resistentes de *Staphylococcus aureus*. A combinação das β -glucanas com antibióticos provoca um efeito sinérgico aumentando o efeito do antibiótico, sendo mais eficiente no tratamento de agentes patogénicos resistentes a antibióticos [49].

- Atividade antioxidante

A *S. cerevisiae* contém várias substâncias endógenas que atuam como antioxidantes. Estas substâncias são componentes enzimáticos, tais como, superóxido dismutase, catalase ou a glutathione redutase, bem como compostos não-enzimáticos como a glutathione, ubiquinona, sulfidrilo ou iões minerais. Além dos antioxidantes que estão presentes no interior das células, as leveduras abrangem, igualmente, potenciais compostos antioxidantes, como é o caso das glucanas β -(1 \rightarrow 3) [38, 50].

A capacidade antioxidante dos polissacarídeos é muito superior à dos monossacarídeos devido ao facto dos polissacarídeos conterem múltiplos átomos de

hidrogénio anoméricos capazes de captar um maior número de radicais livres do que os monossacarídeos, que possuem apenas um hidrogénio anomérico [38].

No mercado dos cosméticos, a aplicação de β -glucanas tem vindo a expandir-se, sendo usadas na prevenção ou melhoramento de irritações da pele, na prevenção do envelhecimento, tendo, igualmente, efeitos radioprotetores, propriedades antioxidantes e revitalizante, sendo usados, também, como estabilizadores em emulsões cosméticas ou em formulações de géis, promovendo/melhorando a sua textura [27].

Os estudos realizados com β -glucanas demonstraram que estes polissacarídeos podem apresentar um papel relevante e promitente na melhoria da saúde do ser humano, tendo aumentado o interesse na identificação das suas características estruturais e biológicas, na expectativa de viabilizar a sua utilização, incrementando deste modo o seu potencial e as suas aplicações a nível industrial.

1.4.2 Manoproteínas

1.4.2.1 Características estruturais e físico-químicas

A camada externa da parede celular é composta por manoproteínas, polissacarídeos neutros constituídos maioritariamente por resíduos de manose (89 % - 96 %) e uma pequena quantidade de outros açúcares como glucose, galactose e xilose, que variam entre 1 % a 7 %, dependendo da estirpe da levedura, e que se encontram ligados a proteínas, cuja percentagem está compreendida no intervalo de 2 % a 36 %, não estando no entanto descritos os tipos de ligações entre estes açúcares e a manoproteína. Contém, ainda, um teor de glucosamina, que varia entre 1 % a 6 % e que fazem a ligação entre a parte proteica através de um resíduo de asparagina, e a parte glicosilada. Estes polissacarídeos são compostos por estruturas curtas e altamente ramificadas em que os resíduos de manose estão unidos por ligações α -(1 \rightarrow 6) com ramificações α -(1 \rightarrow 2) e α -(1 \rightarrow 3). A figura 8 exemplifica os tipos de ligação dos resíduos de manose entre si e a ligação de manose à proteína através de um resíduo de serina [51-53].

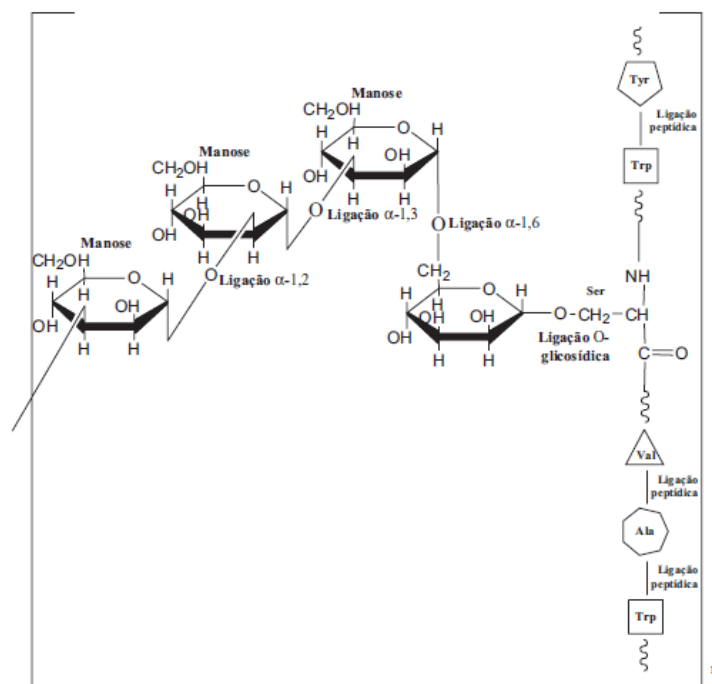


Figura 8 - Representação esquemática das ligações de manose da manoproteína de *Saccharomyces cerevisiae* [54].

As manoproteínas extraídas de leveduras pertencem a duas classes de compostos. Um dos tipos representam manoproteínas compostas por 90 % de carboidratos e 10 % de proteínas, consistindo numa cadeia longa e ramificada de unidades de D-manopiranosose unidas por ligações α -(1 \rightarrow 6), com várias cadeias laterais em α -(1 \rightarrow 2) e α -(1 \rightarrow 3) e unidas a proteínas por ligações glicosídicas do tipo *N*, através de resíduos de asparagina. Esta classe apresenta, fundamentalmente, funções estruturais (Figura 9.a) [55-57].

O outro tipo de manoproteínas apresenta um teor em proteína superior, entre 30-50%, baseando-se numa cadeia curta de mananas composta por apenas 1 a 5 resíduos de manopiranosose ligadas a proteínas por ligações glicosídicas do tipo *O*, através de resíduos de serina ou treonina (Figura 9.b). Esta classe de manoproteínas localiza-se no espaço periplasmático, entre a membrana plasmática e a parede celular e desempenham funções enzimáticas, nomeadamente as invertases externas, as fosfatases ácidas, as asparaginases e as α -galactosidases. Enquanto as manoproteínas da parede são estáveis, as do espaço periplasmático apresentam um grau de *turnover* significativo [56-60].

Na levedura *S. cerevisiae* a fração glicosídica da manoproteína é constituída não só por oligossacarídeos de manose e N-acetilglucosamina, mas também oligossacarídeos acídicos contendo manosilfosfato. Estes resíduos de manosilfosfato encontram-se em vários locais da cadeia de manose, seja nos terminais não-redutores, seja nas ramificações

(Figura 9.a). Nas manoproteínas com ligações do tipo *O* também estão presentes resíduos de manosilfosfato, como é possível observar na figura 9.b [57].

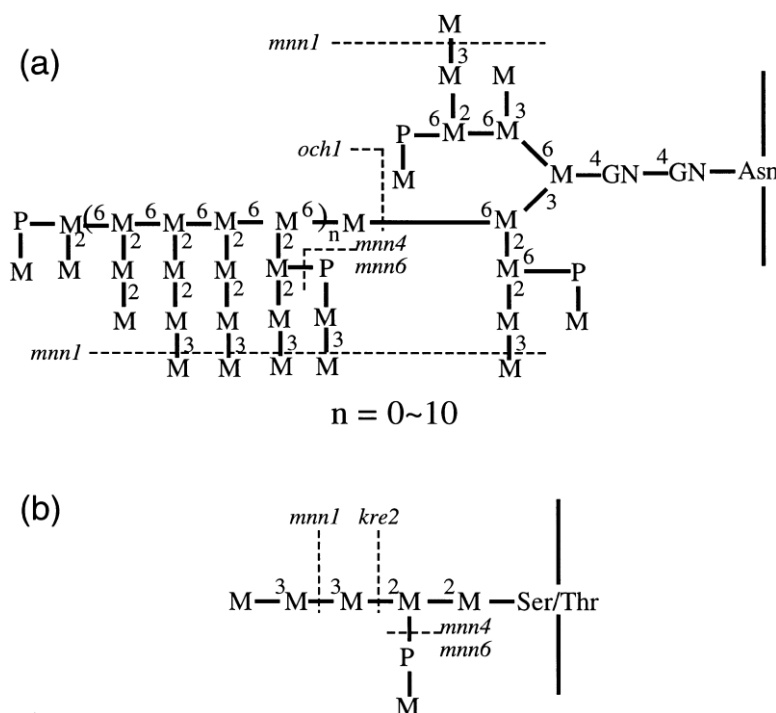


Figura 9 - a) Estrutura da manoproteína de *S. cerevisiae* em ligação glicosídica do tipo *N* a um resíduo de asparagina; b) Estrutura da manoproteína de *S. cerevisiae* em ligação glicosídica do tipo *O* a um resíduo de serina ou treonina. M, manose; GN, N-acetilglucosamina; P, fosfato; Asn, asparagina; Ser, serina; Thr, treonina. [57]

A presença de manosilfosfatos nas cadeias carbonadas das manoproteínas e a consequente existência de ligações fosfodiéster, dão origem a numerosas cargas negativas na superfície celular, sendo responsável pelas propriedades hidrofílicas da parede celular, podendo estar envolvida na capacidade de retenção de água e na proteção contra fatores de stresse como é o caso da desidratação [57].

A bioatividade das manoproteínas de *S. cerevisiae* depende de fatores como a conformação estrutural, peso molecular, método de extração aplicado e solubilidade [61]. As mananas extraídas da parede celular de leveduras, como é o caso da *S. cerevisiae*, são solúveis em água, têm uma massa molecular relativamente pequena, entre 100-200 kDa e podem ser extraídas por métodos simples e com rendimentos elevados, daí o elevado interesse em explorar industrialmente este biopolímero [62, 63].

As manoproteínas desempenham diversas funções, sendo responsáveis pela regulação e controlo da porosidade da parede celular, controlando quer a entrada de compostos externos para o interior celular, como a difusão de proteínas excretoras para o exterior das células [64].

1.4.2.2 Atividades biológicas

- Efeitos antitumorais, antimutagénicos e antioxidantes

As manoproteínas participam em processos de inibição da atividade de células tumorais apresentando, também, efeitos hematopoiéticos e radioprotetores, podendo ser aplicados como adjuvantes no tratamento de doenças como o cancro [52, 61, 62]. A composição em monossacarídeos, o conteúdo em proteínas, a massa molecular e a conformação estrutural são responsáveis pelas diferentes atividades antitumorais *in vivo* e *in vitro* que estes polissacarídeos podem desempenhar [61].

- Atividade bioemulsionante

As manoproteínas extraídas de *S. cerevisiae* são bioemulsionantes bastante eficientes. As propriedades emulsionantes devem-se à presença de uma estrutura anfipática que resulta de ligações covalentes estabelecidas entre os polímeros hidrofílicos de manose e a fração proteica [63, 65].

Uma vez que esta levedura é usada em bebidas e produtos alimentares, espera-se que o emulsionante que esta produz não seja tóxico, podendo ter grandes potencialidades de aplicações na indústria alimentar e cosmética [63]. Estirpes de *S. cerevisiae* usadas em processos biotecnológicos, como é o caso particular da produção de cerveja, constituem fontes importantes para a extração de bioemulsionantes, oferecendo a vantagem de ser um método barato, com uma disponibilidade de biomassa elevada, o que se traduz em altos rendimentos de obtenção de bioemulsionantes comparativamente a fontes sintéticas [63].

1.5 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DA LEVEDURA CERVEJEIRA

O conhecimento das propriedades biológicas e funcionais dos constituintes da parede celular da *Saccharomyces cerevisiae*, particularmente ao nível dos seus polissacarídeos, tem fomentado o interesse no desenvolvimento de métodos de extração e purificação destes compostos.

A extração constitui um dos passos fundamentais para o isolamento e purificação dos mais diversos compostos que fazem parte da constituição de inúmeros produtos

naturais. Na análise de biomateriais a extração é o primeiro passo a desempenhar. Existem diversos métodos de extração que incluem métodos tradicionais e já bastante estudados em *S. cerevisiae* (extrações com água quente, soluções alcalinas, solventes orgânicos e hidrólise enzimática) e métodos mais recentes que, apesar de estarem mais focados para extração de polissacarídeos de origem vegetal, poderão, devido às suas inúmeras vantagens, vir a ser aplicados na extração dos componentes da parede celular de microrganismos, como o caso da levedura em estudo. Entre estas técnicas é possível destacar a extração assistida por ultrassons, extração assistida por micro-ondas e extração assistida por alta-pressão [66].

Na figura 10 estão representados os métodos tradicionais e recentes usados na extração de polissacarídeos, entre outros compostos, sendo importante referir que os métodos recentes funcionam como um complemento aos métodos tradicionais, com a finalidade de melhorar o processo de extração.

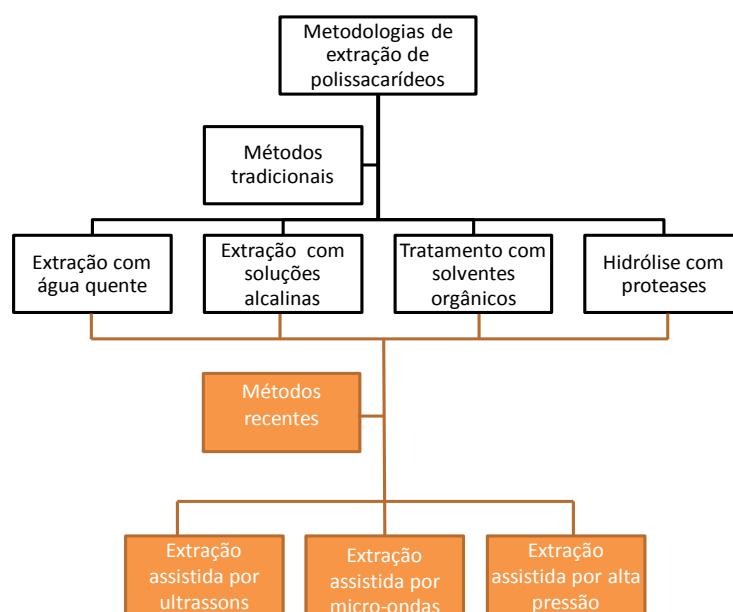


Figura 10 - Representação esquemática dos métodos usados na extração de polissacarídeos.

Os métodos tradicionais aplicados na extração de polissacarídeos em *S. cerevisiae* baseiam-se em processos de extração sequenciais com recurso a soluções alcalinas.

Em *S. cerevisiae*, a maioria dos protocolos de extração de polissacarídeos, nomeadamente de β -glucanas insolúveis, baseiam-se em tratamentos alcalinos para além de aplicação de tratamento com solventes orgânicos para remoção de lípidos [67, 68].

As β -glucanas são extraídas a partir de tratamentos com soluções alcalinas, que podem ser complementados com a utilização de agentes oxidantes, nomeadamente hipoclorito de sódio, como passo para a promoção da oxidação de compostos de “cross-linking”, sendo uma etapa integrante no processo de extração, assim como a subsequente extração com dimetil sulfóxido (DMSO) [69].

Com o intuito de promover o aumento da especificidade e rendimento do processo de obtenção das β -glucanas a partir de leveduras têm vindo a ser incluídas no método de extração etapas enzimáticas [22, 34, 70]. Na tentativa de valorização dos polissacarídeos da levedura, os trabalhos mais recentes utilizam métodos de extração menos agressivos para o ambiente, com maior rentabilidade e economicamente viáveis, através da combinação de diferentes etapas que englobam autólise das células, extrações com água quente, homogeneização e hidrólise com proteases [22].

Na Tabela 3 estão destacados alguns dos métodos tradicionais referidos anteriormente e que foram usados para extração de polissacarídeos, em particular β -glucanas, manoproteínas e quitina, a partir de *S. cerevisiae*.

Tabela 3 – Quadro resumo da aplicação de métodos tradicionais para extração de polissacarídeos existentes na *Saccharomyces cerevisiae*

Método de extração	Polissacarídeos extraídos	Rendimento da extração (%)	Ano	Referência Bibliográfica
Extração alcalina com 3% NaOH	β-Glucanas	---	1976	[68]
Tratamento ácido com 2 N H ₂ SO ₄ ^{a)}	β-Glucanas	53	1998	[71]
	Manoproteínas	37		
	Quitina	2		
Extração alcalina com 3% NaOH Tratamento enzimático com quitinases, glucanases β-(1→3) recombinates, endoglucanases β- (1→6)	β-(1→3) Glucanas	40	2002	[34]
	β-(1→6) Glucanas	13		
	Mananas	42		
	Quitina	5		
Autólise Oxidação com hipoclorito de sódio	β-(1→3) Glucanas	22	2003	[72]
Extração com água quente Tratamento com solventes orgânicos (etanol a 70%) Hidrólise com proteases	β-(1→3) Glucanas	25-26	2003	[70]
	Manoproteínas	14		
Autólise Extração com água quente Homogeneização Tratamento com solventes orgânicos (álcool isopropílico, etanol, acetona, éter de petróleo, metanol) Hidrólise com proteases	β- Glucanas	86	2008	[22]
	Mananas	2		

a) Os valores dos rendimentos de extração são referentes ao tratamento ácido com H₂SO₄, que foi o ácido com melhores resultados experimentais.

1.6 ÂMBITO DO TRABALHO

Os métodos de extração de glucanas e manoproteínas são um fator importante a ter em consideração, assim como o conhecimento destes polissacarídeos quer ao nível da sua composição como a nível estrutural constituem passos fundamentais para o posterior desenvolvimento de uma metodologia eficiente para a obtenção destes polissacarídeos. Sendo assim, os objetivos do trabalho a realizar na valorização dos polissacarídeos da levedura excedentária devem basear-se, fundamentalmente, no seguinte:

- a) Isolamento e caracterização dos polissacarídeos da levedura cervejeira excedentária, através da adaptação de métodos tradicionais, baseados fundamentalmente na extração sequencial com soluções aquosas alcalinas.
- b) Conhecimento da estrutura e tipos de ligações glicosídicas das glucanas e manoproteínas da levedura.
- c) Com base nas metodologias de extração experimentadas propor um método de separação dos polissacarídeos da levedura cervejeira para ser implementado a nível industrial.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostra

Neste trabalho estudou-se a levedura excedentária cedida pela empresa Unicer Bebidas, SA, classificada pela empresa como sendo da espécie *Saccharomyces pastorianus*. Esta levedura foi utilizada na fermentação durante 3 a 7 ciclos fermentativos, conforme a necessidade do processo produtivo e após este período de reutilização foi recolhida por sedimentação natural. A amostra foi fornecida pela Unicer Bebidas, SA no dia 27 de Outubro de 2011.

2.2 Determinação da percentagem de humidade e percentagem de sólidos totais na amostra

A percentagem de humidade da levedura excedentária foi determinada pela perda de peso depois de amostra ter sido seca na estufa. Este método requer apenas uma pequena quantidade de amostra homogénea e pode medir um intervalo eficaz de 0,01 % a 99,99 % de água [73].

As caixas de pesagem foram previamente secas na estufa a 105 °C durante 1 h. Posteriormente foram arrefecidas num exsicador e depois foram pesadas. Adicionaram-se 8 g da levedura excedentária de forma homogénea às caixas de pesagem (cinco réplicas da amostra) e colocaram-se na estufa a uma temperatura de 105 °C, durante 2 h. Após este tempo de secagem colocaram-se as caixas com a amostra no exsicador para arrefecerem, durante 30 min, e depois foram pesadas. Estes passos de secagem e pesagem foram efetuados 3 vezes até peso constante.

A humidade foi calculada como a percentagem de peso perdido após a secagem, através da fórmula 1. A partir do valor da percentagem de humidade calculou-se o teor de matéria seca presente na amostra, pela fórmula 2.

Fórmula 1:

$$\% \text{ Humidade} = \frac{\text{massa da amostra após secagem}}{\text{massa da amostra inicial}} \times 100$$

Fórmula 2:

$$\% \text{ sólidos} = 100 - \% \text{ humidade}$$

2.3 Determinação da proteína solúvel total pelo método do ácido bicinconínico (BCA)

A determinação da quantidade de proteína total pelo método do ácido bicinconínico (BCA). Este método combina a redução do Cu^{2+} a Cu^+ pelas proteínas em meio alcalino com a elevada sensibilidade e seletividade da detecção colorimétrica do catião de cobre (Cu^+) pela reação com o ácido bicinconínico. O produto da reação apresenta uma cor púrpura e é formado pela ligação de duas moléculas de BCA com o íon Cu^+ (figura 11). Este complexo é solúvel em água e exibe elevada absorvância a 562 nm [74].

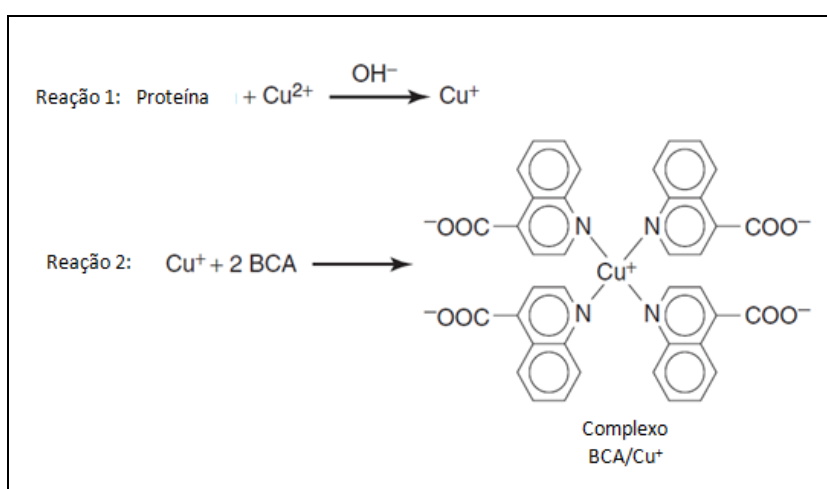


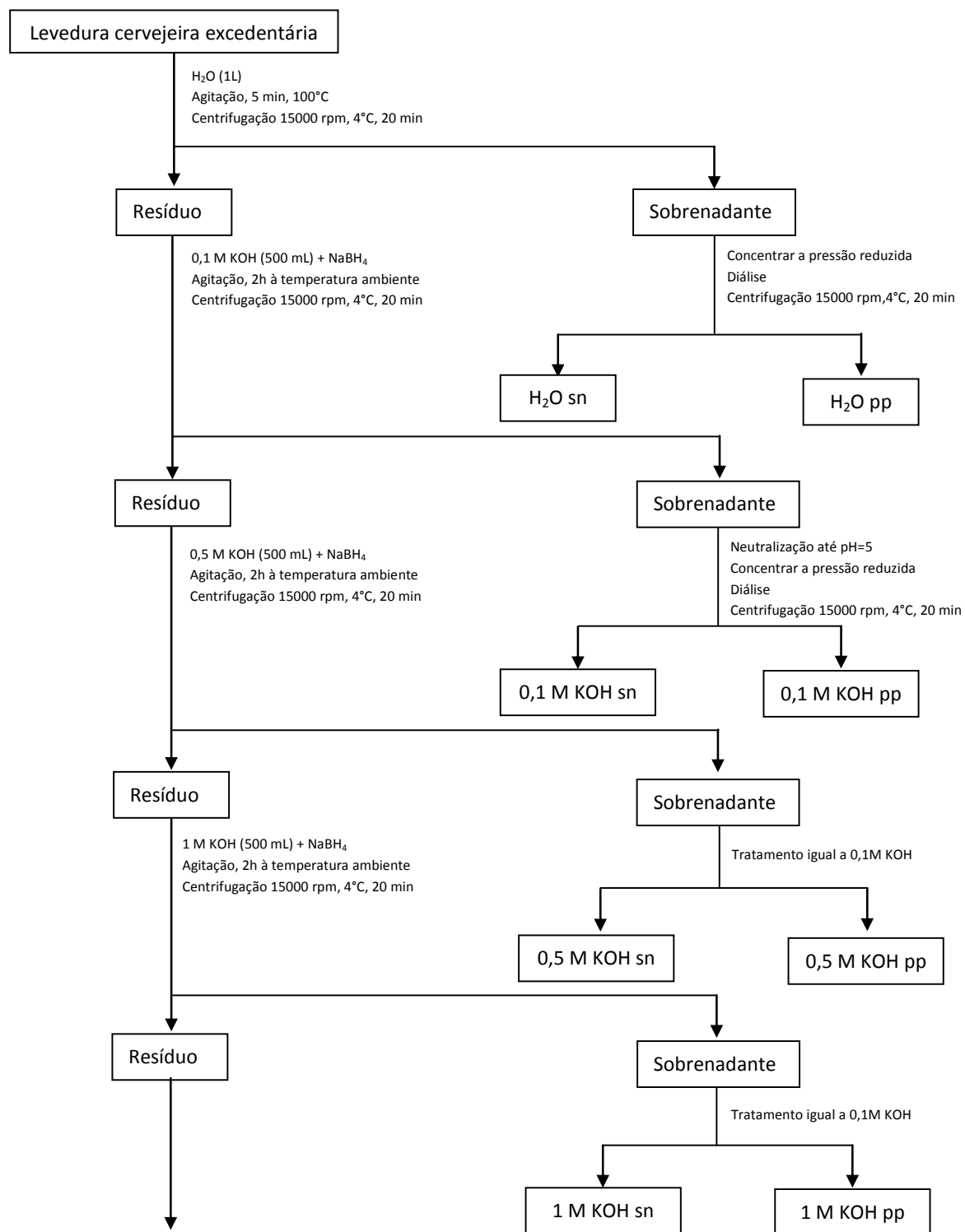
Figura 11 – Representação esquemática das reações envolvidas no método do ácido bicinconínico para determinação da proteína solúvel total [74]

A proteína solúvel presente na levedura excedentária foi determinada pelo referido método, tendo sido estimada com base numa reta de calibração com o padrão de albumina de soro bovino (BSA), com concentrações entre 0,1 e 0,5 mg/mL.

Num tubo adicionaram-se 50 μL de amostra e 1 mL de ácido bicinconínico e homogeneizou-se a solução. A solução foi incubada a 60 $^{\circ}\text{C}$ durante 15 min e depois deixou-se a arrefecer, em repouso, durante 30 min. Após este período foi lida a absorvância a 562 nm.

2.4 Extração sequencial dos polissacarídeos da levedura cervejeira excedentária

O procedimento de extração dos polissacarídeos da levedura cervejeira excedentária encontra-se resumido na figura 12.



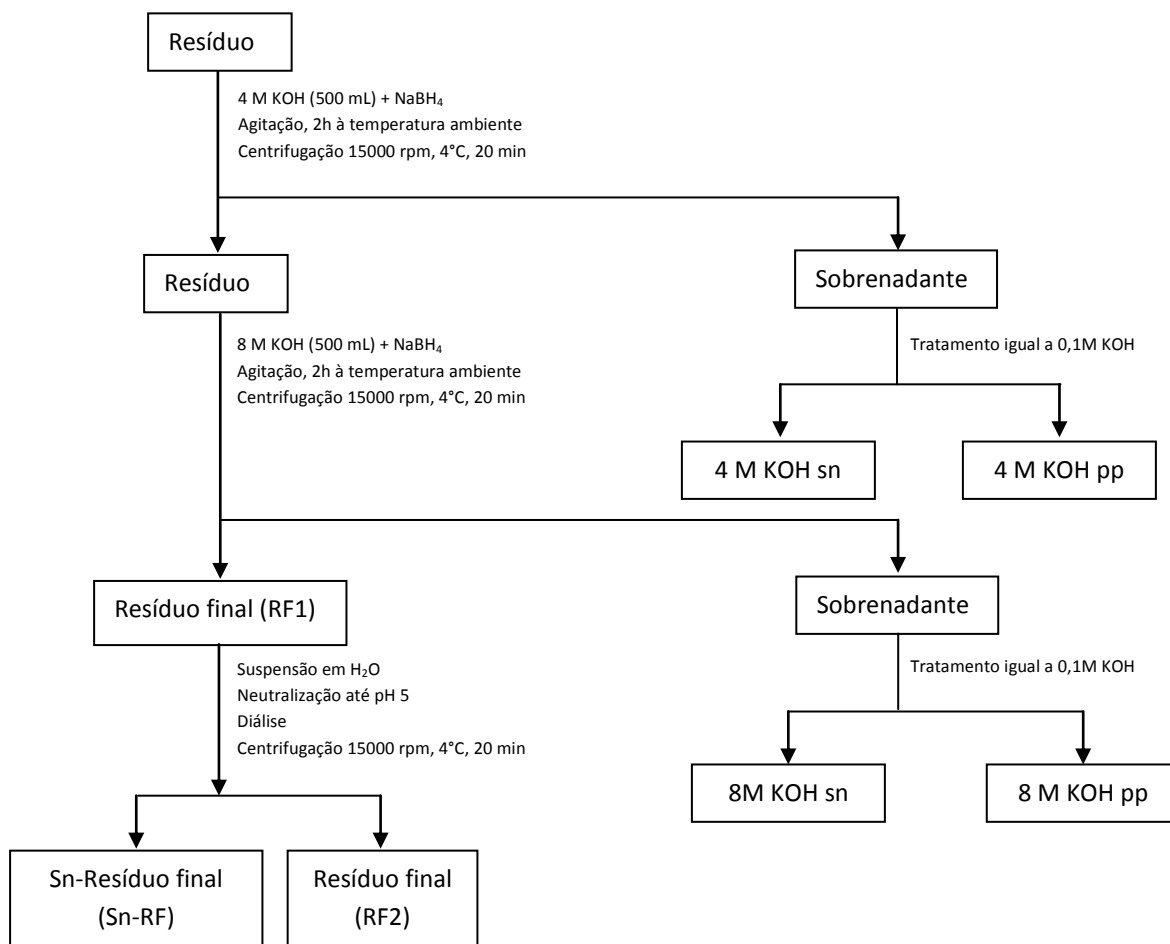


Figura 12 – Representação esquemática da extração sequencial dos polissacarídeos da levedura cervejeira excedentária

Os polissacarídeos da levedura cervejeira excedentária foram extraídos com água quente e soluções alcalinas pela combinação de vários estudos referentes à extração de polissacarídeos, nomeadamente os trabalhos de Fleet *et al.* [68] e Liu *et al.* [22] referentes a leveduras, e também os trabalhos de Selvendran *et al.* [75] e Selvendran e O'Neill [76], que apesar de terem sido aplicados em matrizes de origem vegetal, tiveram grande influência no desenvolvimento da extração sequencial de polissacarídeos da parede celular.

Os polissacarídeos foram sequencialmente extraídos com [1] água quente (1 L), a 100 °C, 5 min; [2] 0,1 M KOH + 20 mM NaBH₄ (500 mL), à temperatura ambiente, 2 h; [3] 0,5 M KOH 20 mM + NaBH₄ (500 mL) à temperatura ambiente, 2 h; [4] 1 M KOH+ 20 mM NaBH₄ (500 mL), à temperatura ambiente, 2 h; [5] 4 M KOH + 20 mM NaBH₄ (500 mL) à temperatura ambiente, 2 h; [6] 8 M KOH + 20 mM NaBH₄ (500 mL), à temperatura ambiente, 2 h.

A levedura excedentária (64,5 g massa seca) foi diluída em 1L de água destilada e aquecida até 100°C, com agitação a 400 rpm, durante 5 minutos. De seguida a solução foi centrifugada a 15000 rpm, a 4°C durante 20 min.

Guardou-se uma pequena quantidade do resíduo (cerca de 40 mg) para análise de açúcares e o restante foi utilizado na extração seguinte (0,1 M KOH). Suspendeu-se essa pequena quantidade de resíduo em água destilada e fez-se diálise numa membrana de 12-14 KDa. Tentou-se concentrar o sobrenadante da extração, no entanto não foi possível devido à formação de muita espuma, tendo-se procedido à diálise do extrato não concentrado. O precipitado formado durante a diálise do sobrenadante da extração com água quente foi recolhido por centrifugação a 15 000 rpm, a 4 °C, durante 20 min e guardado separadamente.

As extrações alcalinas foram efetuadas com soluções aquosas em que o oxigénio foi removido e em atmosfera de azoto. A água destilada utilizada nestas soluções foi previamente fervida durante 20 minutos e deixada arrefecer com borbulhamento de azoto. Quando a água atingia a temperatura ambiente era adicionado o KOH e em seguida o NaBH₄ e, após a solução arrefecer novamente até à temperatura ambiente, perfazia-se com a restante água preparada anteriormente até ao volume final pretendido. As soluções assim preparadas foram utilizadas na hora.

Após cada extração os polímeros solubilizados foram separados do resíduo insolúvel por centrifugação a 15 000 rpm a 4 °C, durante 20 min.

Todos os extratos foram concentrados a pressão reduzida no evaporador rotativo a 35 °C e dialisados. Os extratos de KOH foram acidificados até pH 5 com ácido acético glacial antes de serem dialisados. A adição do ácido foi gradual e para um recipiente de boca larga devido à libertação de H₂ proveniente do NaBH₄. Os precipitados formados durante a diálise dos extratos de KOH foram recolhidos por centrifugação a 15 000 rpm, a 4 °C, durante 20 min e guardados separadamente.

O resíduo rico em glucose (RF1) que permanece após a última extração (8 M KOH + 20 mM NaBH₄) foi suspenso em 400 mL de água e a solução foi acidificada até pH 5 com ácido acético glacial e dialisada. A suspensão foi centrifugada e o sobrenadante (sn-RF) foi removido do resíduo rico em glucose (RF2).

Todos os extratos recolhidos após a diálise foram concentrados e guardados a -20 °C como soluções ou suspensões aquosas congeladas, sendo posteriormente liofilizadas e

uma pequena quantidade de cada resíduo foi também liofilizada. Todas amostras liofilizadas serão submetidas posteriormente a análise de açúcares.

2.5 Tratamento do resíduo final (RF2) com Clorito

2.5.1 Clorito / Hidróxido de potássio

O procedimento utilizado para o tratamento de RF2 com clorito / hidróxido de potássio é uma adaptação dos trabalhos realizados por O'Neill e Selvendran [77] e Yajun Wange *et al.* [72] e está representado na figura 13.

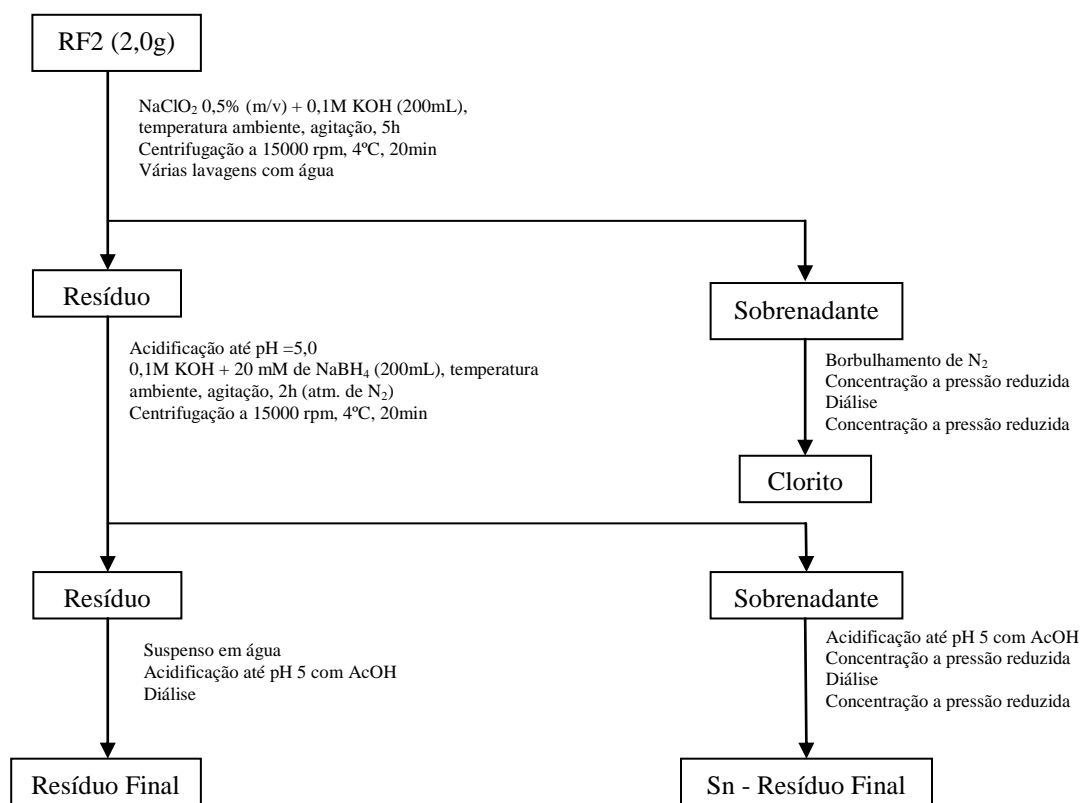


Figura 13 - Tratamento do RF2 da levedura excedentária com clorito/KOH.

O resíduo final obtido na extração com 8 M de KOH – RF2 (2,0 g) foi sujeito a uma oxidação com NaClO₂ 0,5 % (m/v) + 0,1 M KOH (200 mL), à temperatura ambiente durante 5h. Posteriormente centrifugou-se a solução a 15000 rpm, a 4 °C, 20 min.

O resíduo centrifugado foi submetido a lavagens com água destilada, centrifugado a 15000 rpm, 4 °C, 20 min. O resíduo foi, depois, neutralizado com AcOH até pH=5 e sujeito a uma extração com 200 mL de 0,1 M KOH + 20 mM NaBH₄, à temperatura ambiente, com agitação, sob atmosfera de azoto durante 2 h.

Após a extração centrifugou-se a 15000 rpm, a 4 °C, 20 min, tendo-se obtido um resíduo final que foi suspenso em água destilada, neutralizado com AcOH até pH=5, dialisado, liofilizado e foi feita análise de açúcares por GC-FID (ponto 2.10.3).

O sobrenadante resultante desta extração alcalina foi neutralizado também com AcOH até pH=5, concentrado a pressão reduzida a 35 °C, dialisado, liofilizado e os açúcares neutros analisados por GC-FID (ponto 2.10.3).

O sobrenadante resultante do tratamento com o clorito foi combinado entre si e com a água das lavagens do resíduo. A solução resultante foi neutralizada com AcOH e depois borbulhada com azoto até ao desaparecimento da cor amarela.

Posteriormente concentrou-se a solução a pressão reduzida, a 35 °C, fez-se uma diálise, voltou-se a concentrar novamente a 35 °C e no final temos o extrato do clorito.

2.5.2 Clorito / Ácido Acético

O procedimento utilizado para o tratamento de RF2 com clorito / ácido acético é uma adaptação do trabalho realizado por O'Neill e Selvendran [77] e está representado na figura 14.

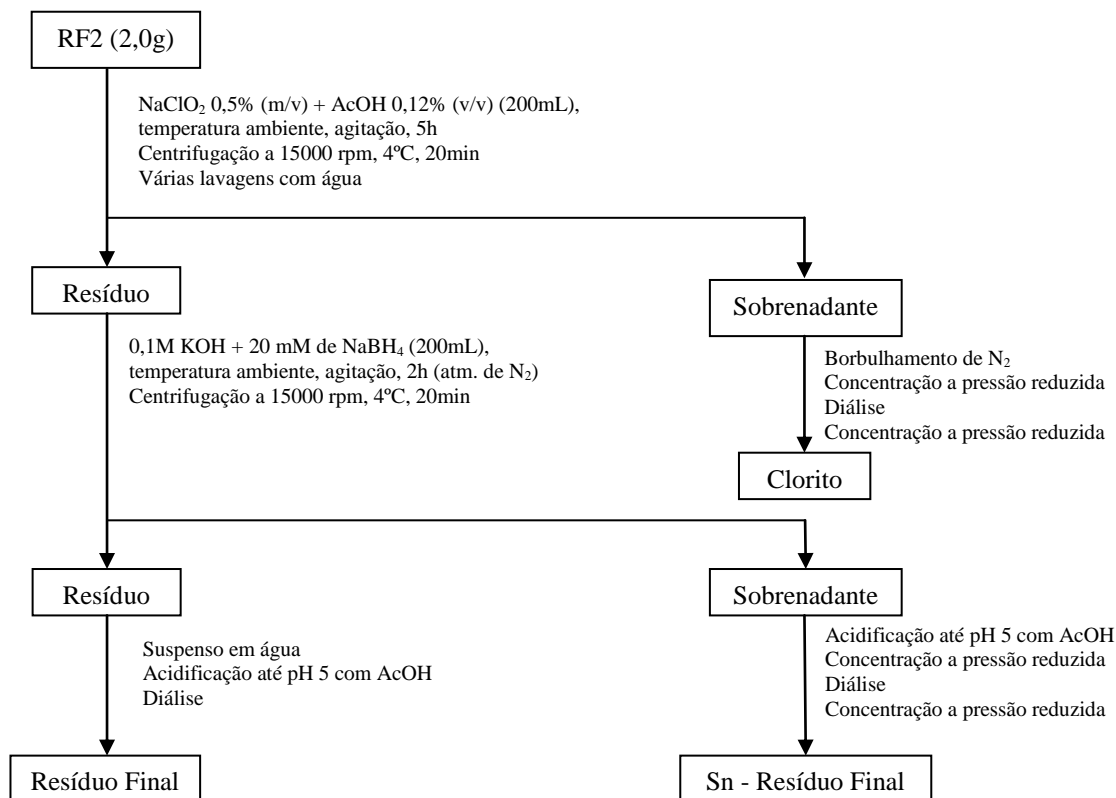


Figura 14 - Tratamento do RF2 da levedura excedentária com clorito/AcOH.

O resíduo final obtido na extração com 8M de KOH – RF2 (2,0 g) foi sujeito a uma oxidação com NaClO₂ 0,5% (m/v) + 0,12% AcOH (200 mL), à temperatura ambiente durante 5h. Posteriormente centrifugou-se a solução a 15000 rpm, a 4 °C, 20 min.

O resíduo centrifugado foi submetido a lavagens com água destilada e centrifugado a 15000 rpm, 4 °C, 20 min. O resíduo foi, depois, sujeito a uma extração com 200 mL de 0,1 M KOH + 20 mM NaBH₄, à temperatura ambiente, com agitação, sob atmosfera de azoto durante 2 h.

Após a extração centrifugou-se a 15000 rpm, a 4 °C, 20 min, tendo-se obtido um resíduo final que foi suspenso em água destilada, neutralizado com AcOH até pH=5, dialisado, liofilizado e foi feita análise de açúcares por GC-FID (ponto 2.10.3).

O sobrenadante resultante desta extração alcalina foi neutralizado também com AcOH até pH=5, concentrado a pressão reduzida a 35 °C, dialisado, liofilizado e os açúcares neutros analisados por GC-FID (ponto 2.10.3).

O sobrenadante resultante do tratamento com o clorito foi combinado entre si e com a água das lavagens do resíduo. A solução resultante foi borbulhada com azoto até ao desaparecimento da cor amarela.

Posteriormente concentrou-se a solução a pressão reduzida a 35 °C, fez-se uma diálise, voltou-se a concentrar novamente a 35 °C e no final temos presente o clorito.

2.6 Precipitação com Etanol

O material solúvel obtido na extração com 8 M KOH foi submetido a precipitações com concentrações crescentes de etanol, tendo como base o estudo de F.M. Nunes *et al* [78].

A amostra (1,0 g) foi dissolvida em 100 mL de água, com agitação, durante 1 h. Posteriormente foi adicionado etanol absoluto até se observar a formação de um precipitado. A mistura foi colocada a 4 °C, com agitação, durante 2 h e, caso houvesse formação de precipitado, este era recolhido por centrifugação a 24000 rpm (28 800 g) a 4 °C, 30 min.

O sobrenadante obtido foi submetido a nova adição de etanol e o precipitado recolhido foi suspenso em água, concentrado por evaporação a pressão reduzida a 30 °C, liofilizado e fez-se análise de açúcares e análise de metilação de acordo com os pontos 2.10.3 e 2.10.4.

O sobrenadante da última precipitação com etanol foi, igualmente, lavado com água, concentrado por evaporação a pressão reduzida a 30 °C, para evaporar o etanol presente, liofilizado e também se procedeu à análise de açúcares de acordo com o ponto 2.10.3.

2.7 Hidrólise Ácida Parcial

A hidrólise ácida parcial foi fundamentada a partir de um estudo realizado por F.M. Nunes *et al.* [78] e promovida com o intuito de solubilizar o resíduo final. Para tal hidrolisaram-se 10 mg de polissacarídeos em 2 mL de TFA 250 mM, a 70 °C, com agitação, durante 30 min. Posteriormente fez-se uma centrifugação a 4000 rpm, durante 20 min, de modo a separar o resíduo do sobrenadante, e ao sobrenadante obtido foi, novamente, promovida a hidrólise ácida parcial nas mesmas condições. Repetiram-se, estes passos até à dissolução completa do resíduo. Para a dissolução completa do resíduo foram necessários 7 ciclos de hidrólise.

Em cada ciclo da hidrólise ácida parcial o sobrenadante obtido foi recolhido, sendo que o ácido (que estava presente no sobrenadante) foi, posteriormente, evaporado sob pressão reduzida a 30 °C.

Os oligómeros obtidos em cada sobrenadante foram fracionados, de acordo com o peso molecular, por cromatografia de exclusão molecular (ponto 2.8.1).

2.8 Cromatografia em Coluna

2.8.1 Cromatografia de Exclusão Molecular por Filtração em Bio-Gel P-30

A cromatografia de exclusão molecular por filtração em Bio-Gel foi utilizada para separar os oligossacarídeos obtidos na hidrólise ácida parcial com TFA, cujo protocolo está descrito em 2.7.

Para o efeito recorreu-se a uma coluna com Bio-Gel P-30. Primeiramente o Bio-Gel foi hidratado com o tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,5) durante 4-5h à temperatura ambiente e, posteriormente, foi empacotado numa coluna de 42,5 cm x 1,6 cm. A coluna foi lavada com o eluente a um fluxo de 0,08 mL/min, com o auxílio de uma bomba peristáltica. A amostra foi suspensa em 1 mL de tampão e, de seguida, introduzida na coluna. Recolheram-se frações de 2 mL, tendo sido, uma pequena quantidade usada para o método colorimétrico - fenol/ácido sulfúrico, de modo a detetar a presença de carboidratos em cada fração (ponto 2.10.1). Foram recolhidas 55 frações (2 mL cada uma), que depois de analisadas pelo método colorimétrico - fenol/ácido sulfúrico, passaram a constituir apenas 2 a 4 frações, de acordo com os picos obtidos em cada cromatograma. Essas frações

foram concentradas, dialisadas por membranas de diálise de poro 12-14 kDa e depois de liofilizadas foram feitas análises das ligações glicosídicas (ponto 2.10.4).

2.9 Tratamento enzimático do resíduo final

O tratamento enzimático foi efetuado ao resíduo final teve como base o trabalho desenvolvido por P. Dikit *et al.* [55]. Este foi tratado com duas enzimas diferentes com o objetivo de se conhecerem o tipo de configurações anoméricas existentes no resíduo final.

No tratamento com a celulase o resíduo final (10 mg) foi diluído com 5 mL de tampão acetato 20 mM, pH 5,0 (cf = 2 mg/mL). A amostra foi hidrolisada com uma celulase de *Aspergillus niger* 1,5 U/mg e incubada a 37 °C, com agitação durante 4 h. A reação enzimática foi parada aumentando a temperatura do banho até aos 100°C e deixando ferver 10 min.

Para testar a eficiência da atividade da enzima fez-se um controlo positivo e um controlo negativo, tendo-se procedido do modo descrito anteriormente, mas substituindo o resíduo final por 10 mg de papel científico e 10 mg de α -amilose, respetivamente.

As três soluções foram posteriormente dialisadas por membranas de diálise de poro 12-14 kDa, liofilizadas e foi feita análise de metilação do resíduo final tratado com a celulase, como descrito em 2.10.4.

Por sua vez, na hidrólise enzimática com a α -amilase o resíduo final (10 mg) foi diluído com 5 mL de tampão fosfato 50 mM, pH 7,0 (cf = 2 mg/mL). A amostra foi depois hidrolisada com uma α -amilase de *Bacillus subtilis* 90 U/mg e incubada a 25 °C, com agitação durante 2 h. A reação enzimática foi parada aumentando a temperatura do banho até aos 100 °C e deixando ferver 10 min.

Para testar a eficiência da atividade da enzima fez-se um controlo positivo e um controlo negativo, tendo-se procedido do modo descrito anteriormente, mas substituindo o resíduo final por 10 mg de α -amilose e 10 mg de papel científico, respetivamente.

As três soluções foram posteriormente dialisadas com membranas de poro 12-14 kDa, liofilizadas e foi feita análise de metilação do resíduo final tratado com a α -amilase, como descrito em 2.10.4.

2.10 Determinação de Carboidratos

2.10.1 Método Colorimétrico - Fenol/Ácido Sulfúrico

O método colorimétrico usando fenol/ácido sulfúrico foi proposto por Dubois *et al.* [79] e foi utilizado e adaptado neste trabalho, para a determinação da presença de carboidratos nas frações obtidas pela cromatografia de filtração em gel.

A cada tubo de ensaio foi adicionado 100 µL de amostra, 200 µL de solução aquosa de fenol a 5% e 1 mL de H₂SO₄ concentrado. A solução foi agitada e deixada a reagir, no escuro, durante 30 min. Posteriormente foi lida a absorvância no comprimento de onda de 490 nm.

2.10.2 Método Colorimétrico para Determinação de Ácidos Urônicos

A determinação de ácidos urônicos baseou-se numa adaptação do trabalho desenvolvido por Selvendran *et al* [80]. Transferiram-se 500 µL das amostras hidrolisadas durante o passo da hidrólise na análise de açúcares neutros e diluiu-se com 1,5 mL de água destilada e preparam-se os padrões para a curva de calibração usando uma solução padrão de ácido galactúrico (200 µg/mL).

Foram utilizados 3 tubos para cada amostra (1 branco e 2 réplicas) com 0,5 mL de amostra. Os tubos referentes a cada amostra e os padrões foram colocados num banho de gelo e adicionaram-se a todos eles 3 mL de ácido bórico 50 mM preparado em ácido sulfúrico concentrado, tendo sido, posteriormente, colocados num banho a 100 °C durante 10 min.

Com os tubos já arrefecidos, adicionaram-se 100 µL de MFF (*m*-fenilfenol 0,15% (m/v) em 0,5% (m/v) NaOH) a 2 dos 3 tubos de cada amostra e padrão e colocaram-se no escuro a reagir durante 30 min.

Após este tempo de reação, as soluções foram agitadas de forma a promover uma boa homogeneização e foi lida a absorvância a 520 nm.

2.10.3 Análise de Açúcares Neutros

A análise de açúcares neutros efetuada neste trabalho é uma adaptação do método de Blakeney *et al.* [81]

Hidrólise

Pesaram-se 1-2 mg de amostra para um tubo de cultura e adicionaram-se 200 μL de H_2SO_4 72 % (m/m), tendo-se deixado reagir à temperatura ambiente, durante 3 h com agitação ocasional. No fim deste período de reação a amostra foi diluída com 2,2 mL de água destilada, perfazendo a concentração de 1 M, agitada e hidrolisada a 100 °C num bloco de aquecimento durante 2,5 h. Após 1 h, os tubos foram colocados num banho de água e foram retirados 0,5 mL de hidrolisado para análise de ácidos urónicos (ponto 2.10.2).

A hidrólise prosseguiu durante mais 1h30 e após este período, arrefeceu-se a amostra num banho de gelo.

Redução e acetilação

Nesta fase do protocolo foram adicionados 200 μL de padrão interno (2-desoxiglucose 1 mg/mL) à amostra hidrolisada.

Transferiu-se 1 mL do hidrolisado para novos tubos de cultura e promoveu-se a neutralização do ácido com 200 μL de NH_3 a 25% e de seguida, foram adicionados 100 μL de solução de 15 % (m/v) NaBH_4 em NH_3 3 M (esta última solução preparada na hora) para a redução dos açúcares a alditóis. Esta solução foi agitada e incubada a 30 °C durante 1 h.

O tubo foi, depois, arrefecido em banho de gelo e adicionaram-se 50 μL de AcOH (2x) para eliminar o excesso de NaBH_4 .

Transferiram-se 300 μL da solução para tubos SOVIREL e, num banho de gelo, foram adicionados 450 μL de 1-metilimidazol (catalisador) e 3 mL de anidrido acético (agente acetilante), agitou-se bem e deixou-se a reagir a 30 °C durante 30 min.

Num banho de gelo, foram adicionados 3,0 mL de água destilada, para decompor o excesso de anidrido acético e 2,5 mL de diclorometano para promover a extração dos acetatos de alditol.

Após agitação e centrifugação a 3000 rpm durante 30 s para a separação das duas fases, a camada aquosa foi aspirada por sucção. À camada orgânica foram adicionados, novamente, 3,0 mL de água destilada e 2,5 mL de diclorometano, centrifugada e a fase aquosa aspirada. A fase orgânica foi lavada 3 vezes com 3 mL de água, de forma a remover completamente o 1-metilimidazol. A fase orgânica final, onde estão presentes os acetatos de alditol, foi evaporada num evaporador centrífugo e lavada com acetona anidra.

Análise por GC-FID

Os acetatos de alditol foram dissolvidos em 50 µL de acetona anidra e analisados por cromatografia em fase gasosa, GC-FID, num cromatógrafo Perkin Elmer – Clarus 400 (CR1) usando uma coluna capilar DB-225 de 30 m comprimento, 0,25 mm de diâmetro, 0,15 µm de espessura. A fase estacionária utilizada constituída por 50 % de cianopropilofenilo e 50 % de metilpolisiloxano.

Foram injetados 2 µL de amostra com a temperatura do injetor a 220 °C e o detetor a 230 °C, em modo “split”. O programa de temperaturas utilizado foi o seguinte: temperatura inicial 200 °C, aumento até 220 °C a 40 °C/min e aumento até 230 °C a 20 °C/min. O gás de arraste foi H₂ com uma pressão de 17 psi, sendo utilizado na chama do detetor ar e H₂ com um fluxo de 45 mL/min e 450 mL/min, respetivamente.

2.10.4 Análise das Ligações Glicosídicas por Metilação

A análise das ligações glicosídicas por metilação parcial de polissacarídeos proposta por Ciucanu e Kerek (1984) baseia-se em metilar os grupos hidroxilo livres e acetilar os hidroxilos que estabeleciam as ligações glicosídicas. Para a obtenção dos acetatos de alditol parcialmente metilados, procede-se a uma dissolução da amostra com DMSO, ativação do polissacarídeo por tratamento com NaOH (s), metilação com CH₃I, hidrólise, redução e acetilação.

Reação de Metilação

As amostras (1-2 mg) foram secas sob vácuo na presença de P₂O₅ e adicionaram-se 2 mL de DMSO (seco com peneiros moleculares 3 Å), tendo-se deixado em agitação durante a noite para a dissolução completa da amostra.

Sob atmosfera de árgon, algumas lentilhas de NaOH foram trituradas (num almofariz) até à obtenção de um pó fino e adicionaram-se à solução cerca de 40 mg. As amostras foram deixadas a reagir durante 30 min, à temperatura ambiente e com agitação. Após este período adicionaram-se 80 μ L de CH_3I com uma seringa e deixou-se a reagir durante 20 min com agitação vigorosa. Adicionaram-se, posteriormente, 2 mL de água destilada e promoveu-se a neutralização da base com a adição HCl 1M, tendo-se verificado o pH da solução com papel indicador.

As amostras foram dialisadas contra uma solução de 50% EtOH/50% H_2O , tendo-se mudado a solução 3 vezes, e no final foram evaporadas até à secura, no evaporador centrífugo. De seguida voltaram-se a colocar as amostras na estufa do vazio, durante 2/3h e efetuaram-se os mesmo passos descritos anteriormente até à fase da neutralização inclusive. Foram adicionados 3 mL de diclorometano e após agitação e centrifugação a 3000 rpm durante 30s para a separação das duas fases, a camada aquosa foi aspirada por sucção. À camada orgânica foram adicionados, novamente, 2,0 mL de água; a solução foi agitada e centrifugada nas mesmas condições e a fase aquosa aspirada. Repetiu-se este passo da lavagem da fase orgânica mas com 3 mL de água destilada, até o diclorometano ficar límpido. A fase orgânica final foi evaporada num evaporador centrífugo.

Hidrólise, Redução e Acetilação

De modo a hidrolisar o material metilado foram adicionados 500 μ L de TFA 2 M e incubou-se a 121 $^{\circ}\text{C}$ durante 1 h, com agitação ocasional. No final o ácido foi evaporado na speedvac.

Adicionaram-se, à amostra hidrolisada, 20 mg de NaBD_4 e 300 μ L de NH_3 2M, tendo-se deixado a reagir durante 1 h a 30 $^{\circ}\text{C}$. A amostra foi arrefecida num banho de gelo e no final adicionaram-se 50 μ L de ácido acético glacial (2x), para eliminar o excesso de BD_4^- .

A acetilação foi promovida por adição de 450 μ L de 1-metilimidazol e 3 mL de anidrido acético, tendo-se deixado a reagir durante 30 min a 30 $^{\circ}\text{C}$.

Num banho com gelo adicionaram-se 3,0 mL de água destilada para decompor o excesso de anidrido acético e 2,5 mL de diclorometano; agitou-se muito bem para extrair os acetatos de alditol e centrifugou-se a 3000 rpm, 30 s, de modo a separar as duas fases. A fase aquosa foi aspirada por sucção e repetiu-se o passo anterior.

A camada orgânica foi lavada com 3 mL de água destilada, agitou-se, centrifugou-se e removeu-se totalmente a fase aquosa. A lavagem foi repetida com mais 3 mL de água destilada.

O diclorometano foi evaporado no evaporador centrífugo.

Análise por GC-qMS

Os acetatos de alditol parcialmente metilados foram dissolvidos em 20 µL de acetona anidra (dependendo da concentração da amostra) e analisados por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa com analisador quadrupólo, GC-qMS, num cromatógrafo GC-qMS Agilent Technologies 6890N Network, usando uma coluna capilar DB-1 de 30 m comprimento, 0,25 mm de diâmetro, 0,15 µm de espessura.

Foram injetados 0,2 µL de amostra com a temperatura do injetor a 220 °C em modo “split” durante 5 min. O programa de temperaturas utilizado foi o seguinte: a temperatura inicial foi de 45 °C, subida até 140 °C a 10 °C/min, subida até 170 °C a 0,5 °C/min e por último subida até 280 °C a 15 °C/min.

2.11 Espectroscopia de Infravermelho com Transformadas de Fourier (FTIR)

O FTIR foi realizado com recurso a uma célula de reflexão atenuada total – do inglês “attenuated total reflection” – ATR. Esta técnica baseia-se na aplicação da amostra numa superfície de material com índice de refração elevado (por exemplo: um cristal), conhecido como elemento de reflexão interno (IRE)[82, 83].

Os espectros de FTIR foram obtidos com um espectrofotómetro IFS55 da marca Bruker com célula Golden-Gate de reflexão única com cristal de reflexão total atenuada (ATR).

Todos os espectros foram adquiridos com resolução de 8 cm^{-1} e 128 *scans* e com um intervalo de número de onda entre $4000\text{-}600\text{ cm}^{-1}$. Para cada amostra foi utilizada uma quantidade suficiente para cobrir o cristal e de seguida a amostra foi pressionada contra o mesmo. Para cada amostra analisada no FTIR foram feitas cinco réplicas, tendo-se procedido da mesma forma.

De forma a se encontrarem diferenças significativas entre as amostras fez-se uma análise quimiométrica dos espectros, a partir da análise dos componentes principais (PCA), tendo-se usado a região de $1200\text{-}600\text{ cm}^{-1}$. O tratamento estatístico foi efetuado no programa informático *Cats 97®*, desenvolvido em parceria pela Universidade de Aveiro e o Instituto Nacional Agronómico de Paris-Grignon.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Extração sequencial e precipitação com etanol

Na tabela 4 estão representadas as quantidades de polissacarídeos solubilizados na extração sequencial com água quente e soluções alcalinas de KOH a partir da levedura cervejeira excedentária e as respectivas composições em carboidratos.

Tabela 4 - Análise de carboidratos e rendimentos de extração da extração sequencial e precipitação com etanol

Fração	Rendimento em massa (%)	Rendimento carboidratos extraídos (%)	Carboidratos (mol %)							Carboidratos totais* (µg/mg)
			Rib	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Ác.Ur.	
Levedura inicial			-	2	1	19	v	71	7	485
H ₂ O, 100°C										
sn.	0,4	10,1	4	9	8	27	2	53	-	644
pp.	0,5	7,0	9	4	4	16	1	65	-	364
resíduo			3	3	v	20	-	73	-	331
sn. resíduo			3	2	1	21	-	74	-	269
0,1 M KOH										
sn.	5,4	2,9	46	1	1	37	-	19	-	258
pp.	1,2	0,4	47	2	1	31	-	20	-	146
resíduo			1	1	v	17	-	81	-	430
sn. resíduo			2	4	v	22	-	72	-	215
0,5 M KOH										
sn.	4,4	4,0	-	1	1	90	-	8	-	434
pp.	4,2	0,6	-	2	2	59	-	39	-	69
resíduo			-	1	v	9	-	89	-	428
sn. resíduo			-	2	v	28	-	70	-	401
1 M KOH										
sn.	3,6	2,7	-	5	3	81	-	11	-	371
pp.	3,6	1,0	-	1	1	41	-	57	-	135
resíduo			-	2	-	4	-	94	-	505
sn. resíduo			-	2	-	43	-	55	-	404
4 M KOH										
sn.	7,1	6,0	-	1	1	85	-	13	-	410
pp.	4,5	1,1	-	4	-	29	-	67	-	121
resíduo			-	1	-	2	-	97	-	608
sn. resíduo			-	2	-	27	-	72	-	387
8M KOH										
sn.	1,2	1,9	-	1	-	65	-	35	-	760
Et 37,5%	1,0 (63,6) ^{a)}	2,0 (88,8) ^{b)}	-	1	v	v	-	99	-	966
Et 80%	0,1 (5,9)	0,2(8,1)	-	v	v	74	-	26	-	950
EtSn	0,01 (8,2)	0,02(0,8)	-	7	2	24	-	68	-	66
pp.	0,9	0,7	-	1	-	10	-	89	-	346
resíduo final	20,9	24,2	-	1	-	1	-	98	-	566
sn.resíduo final	11,6	16,5	-	1	-	12	-	88	-	693

*Valores expressos em µg de açúcar anidro por mg.

v = Quantidades vestigiais

a) Os valores entre parêntesis dizem respeito ao rendimento em massa em função do sobrenadante de 8 M de KOH

b) Os valores entre parêntesis dizem respeito ao rendimento de extração em função do sobrenadante de 8 M de KOH

Foi feita uma primeira caracterização química da levedura *S. pastorianus*, em que o teor de humidade da amostra é de 89,9 % e com uma percentagem de sólidos totais de 10,1%. A quantidade de proteína solúvel é de aproximadamente 26,5 %, relativamente à quantidade total de carboidratos da parede celular esta é de 48,5 %, sendo que os carboidratos maioritários são respetivamente a glucose (71 %) e a manose (19 %) e em menor quantidade é possível encontrar resíduos de arabinose, xilose, galactose e ácidos urónicos. Segundo a literatura a xilose e galactose podem estar associadas às manoproteínas, embora não seja conhecido o modo como estes monossacarídeos se ligam à manoproteína. A glucose faz parte das glucanas, descritas como o principal polissacarídeo da parede celular da levedura e que pode estar ligadas a outros componentes da parede celular, podendo ligar-se a resíduos de N-acetilglucosamina, através de ligações β -(1 \rightarrow 4) entre o terminal não-redutor da glucana e o terminal redutor da cadeia de quitina [31, 52]. Em relação à arabinose não existe informação relativa à presença deste açúcar na levedura, nem se este açúcar faz parte integrante da estrutura dos polissacarídeos da parede ou se está na forma livre, como monossacarídeos ou dissacarídeos.

Os polissacarídeos constituintes da levedura cervejeira foram extraídos com água quente e soluções alcalinas pela combinação de vários estudos referentes à extração sequencial de polissacarídeos, destacando-se os trabalhos de Fleet *et al.* [68] e Liu *et al.* [22] e também estudos de Selvendran *et al.* [76] e Selvendran e O'Neill [75], conforme descrito no ponto 2.4 e figura 12. O objetivo da extração sequencial foi promover a solubilização dos polissacarídeos numa forma o mais próxima possível da forma nativa, preservando, assim, ao máximo a estrutura e características físico-químicas destes polímeros.

A extração com água quente permitiu solubilizar 17,1 % de carboidratos e com a solução alcalina de 0,1 M de KOH solubilizaram-se apenas 3,3 % de hidratos de carbono. Na extração com água quente solubilizaram-se 27 % de manoproteínas e 53 % de glucanas. No caso da extração com 0,1 M KOH extraiu-se principalmente ribose (46 %), açúcar constituinte do ácido ribonucleico (RNA) e que está diretamente relacionado com a transmissão e tradução genética e envolvido na síntese de proteínas na célula; 37 % de manoproteínas e 19 % de glucanas. Em relação aos rendimentos em massa estes são mais significativos no sobrenadante da extração com 4 M de KOH onde foram solubilizadas maioritariamente manoproteínas e no resíduo final e sobrenadante do resíduo final é

possível verificar que o rendimento em massa é de 20,9 % (m/m) e 11,6 % (m/m), respetivamente. Estas extrações com soluções alcalinas mais fortes foram as que permitiram obter maior massa de carboidratos extraídos.

Atendendo aos rendimentos de carboidratos extraídos, a solubilização dos polissacarídeos nas soluções alcalinas foi relativamente baixa, uma vez que as extrações de 0,1 M a 1 M solubilizaram apenas 3,3-4,6 % de hidratos de carbono, enquanto as extrações com soluções alcalinas fortes permitiram solubilizar uma quantidade mais elevada, nomeadamente, 7,1 % com 4 M KOH e 18,4 % com 8 M KOH. Na extração com água quente o rendimento foi maior (17,1 % em carboidratos) em relação às restantes extrações alcalinas, à exceção da 8 M de KOH. Estes carboidratos solubilizados poderão não ser apenas carboidratos da parede celular da levedura mas também carboidratos presentes no citoplasma celular e açúcares adicionados na fase da produção da cerveja. Como a levedura é recolhida após sedimentação e não foi filtrada podem estar presentes esses açúcares, como maltoses e maltodextrinas.

A extração com 0,5 M e 1 M de KOH não diferem muito na quantidade de carboidratos que solubilizam, cerca de 81-90 mol % de manose e entre 8-11 mol % de glucose. Na extração com 4 M KOH extraíram-se principalmente manoproteínas (85 mol %) e 13 mol % de glucanas, enquanto na extração com 8 M KOH extraíram-se 65 mol % de manoproteínas e 35 mol % de glucanas. O resíduo final contém ainda 34 % de glucanas da amostra inicial sendo composto por 98 % de glucose.

O sobrenadante do resíduo final foi sujeito a precipitações graduais com etanol. Com 37,5 % (m/v) de etanol obteve-se um precipitado – Et37,5 % – muito rico em carboidratos (97 % de carboidratos) dos quais 99 % correspondem a glucose. O precipitado obtido com 80 % de etanol tem um teor de carboidratos totais um pouco mais baixo, cerca de 95 %, dos quais a manose é o açúcar maioritário, com uma percentagem molar de 74 %, seguida da glucose com apenas 26 %; por sua vez o sobrenadante resultante desta precipitação é muito pobre em carboidratos, com apenas 7 % de carboidratos totais, dos quais 24 % é manose e 68 % glucose. A precipitação com etanol mostrou ser um método eficiente na purificação de glucanas. A maior parte destes polissacarídeos (cerca de 64 % (m/m) do sobrenadante do resíduo final) precipitou com uma concentração baixa de etanol (37,5 %).

Com 80 % de etanol precipitaram-se principalmente manoproteínas (74 %) e 26 % de glucanas que são mais solúveis em etanol e consequentemente mais ramificadas, comparativamente às glucanas que precipitam com 37,5 % de etanol.

3.1.1 Tratamento com clorito

Pela extração sequencial verificou-se que o resíduo final continua a ser muito insolúvel, mesmo após a utilização de soluções alcalinas de 8 M de KOH. Apesar dos carboidratos serem o principal constituinte deste resíduo (56,6 %) é possível que haja igualmente uma quantidade significativa de glicoproteínas, um dos constituintes maioritários das leveduras, e as ligações covalentes que estas estabelecem com os polissacarídeos podem contribuir para a formação de uma rede muito forte, estando desta forma a dificultar a extração destes polímeros. Com o intuito de solubilizar essas glicoproteínas e contribuir para a solubilização das glucanas, o resíduo final foi submetido a dois tratamentos de oxidação: 1) clorito/KOH e 2) clorito/ácido acético; o resíduo obtido em cada um dos tratamentos foi lavado abundantemente com água e submetido a nova extração com 0,1M KOH. Com estes dois tratamentos pretendeu-se estudar o efeito do pH na solubilização dos polissacarídeos, daí que se tenha efetuado o tratamento de oxidação com ácido acético, já descrito em vários estudos relativos a matrizes de origem vegetal para solubilização de glicoproteínas e polissacarídeos pécnicos e realizou-se, igualmente, um tratamento com clorito em meio básico, uma vez que estudos referem que a atividade proteolítica do clorito é maior em meio alcalino [77, 84].

Na tabela 5 estão representadas as quantidades de polissacarídeos solubilizados e as respetivas composições em carboidratos das frações obtidas com o tratamento com clorito/KOH e clorito/AcOH ao resíduo final.

Tabela 5 - Análise de carboidratos e rendimentos de extração do tratamento com clorito ao resíduo final

Fração	Rendimento em massa (%) ^{a)}	Rendimento carboidratos extraídos (%) ^{a)}	Carboidratos da parede celular (%mol)				Carboidratos totais* (µg/mg)
			Ara	Xyl	Man	Glc	
Tratamento Clorito/KOH							
sn. tratamento clorito + H ₂ O lavagem	16,4	8,1	2	v	8	90	281
Resíduo oxidado + extração 0,1 M KOH							
sn.resíduo	0,73	0,98	v	v	2	97	759
resíduo	54,8	89,0	v	v	v	99	919
Tratamento Clorito/AcOH							
sn. tratamento clorito + H ₂ O lavagem	22,4	6,5	3	1	5	91	165
Resíduo oxidado + extração 0,1 M KOH							
sn.resíduo	8,5	4,5	1	1	7	91	566
resíduo	49,0	76,6	v	v	1	99	885

* Valores expressos em µg de açúcar anidro por mg.

v = Quantidades vestigiais

a) Rendimentos calculados a partir do resíduo final

No tratamento com NaClO₂ 0,5 % (m/v) + 0,1 M KOH apenas 9,1% (0,98 % + 8,1 %) de carboidratos foram extraídos, tendo-se obtido um resíduo final rico em glucose (99 %) e no tratamento com NaClO₂ 0,5% (m/v) + 0,12% AcOH (v/v), foi possível extrair uma quantidade um pouco maior de carboidratos – 11,5 % (6,5 % + 4,5 %), no entanto este rendimento de extração é pouco significativo, sendo que o resíduo final obtido contém ainda 76,6 % dos carboidratos do resíduo final. No final deste tratamento o resíduo obtido é enriquecido em glucose (99 %).

Os resultados obtidos parecem indicar a existência de ligações de "cross-linking" estabelecidas entre os polímeros constituintes da levedura cervejeira, formando um complexo muito compacto e insolúvel, composto por polissacarídeos e possivelmente por glicoproteínas. O tratamento com o clorito permitiu solubilizar material não polissacarídico presente na levedura, uma vez que os sobrenadantes após o tratamento com o clorito são pobres em carboidratos, apresentando apenas 28,1 % de polissacarídeos no tratamento do clorito em meio básico e 16,5 % no tratamento do clorito em meio ácido, sendo constituídos basicamente por material polimérico pobre em hidratos de carbono, enquanto os sobrenadantes da extração com 0,1 M de KOH do resíduo oxidado com clorito/KOH e do resíduo oxidado com clorito/ AcOH apresentam um teor de açúcar mais elevado, 76 % e 57 % respetivamente.

Por sua vez o resíduo final obtido em ambos os tratamentos com o clorito ficou enriquecido em carboidratos, sendo o resíduo final (Clorito/KOH) constituído por 91,9 % de carboidratos e o resíduo final (Clorito/AcOH) constituído por 88,5 % de carboidratos. Estes resíduos são compostos apenas por glucanas, não tendo sido solubilizadas, permanecendo insolúveis no resíduo.

Assim sendo, o tratamento com o clorito não foi eficiente na tentativa de solubilizar as glucanas presentes no resíduo final, mas promoveu a extração de compostos não polisacarídicos, que fazem parte do sobrenadante do tratamento de oxidação, e a obtenção de um resíduo rico em resíduos de glucose.

3.1.2 Análise das ligações glicosídicas

Com o intuito de se conhecer mais sobre a estrutura e tipos de ligações glicosídicas associadas às manoproteínas e glucanas extraídas na extração sequencial e no tratamento de oxidação com o clorito foram feitas análises de metilação a algumas frações da extração sequencial nomeadamente ao sobrenadante da extração com água quente, sobrenadante da extração com 4 M de KOH, sobrenadante do resíduo de 8 M de KOH e resíduo final da extração com 8 M de KOH, ao precipitado de 37,5 % (Et 37,5 %) obtido após a precipitação com etanol do sobrenadante do resíduo de 8 M de KOH e ao resíduo final tratado com clorito/ KOH (tabela 6).

Tabela 6 - Ligações glicosídicas de algumas frações da extração sequencial, Et 37,5% e resíduo tratado com clorito/KOH

Ligação glicosídica	Fração (% mol)*					
	sn H ₂ O, 100°C	sn 4M KOH	Sn-Rf 8M KOH	Et 37,5 %	Rf-8M KOH	Clorito/KOH
t-Ara	3,6	-	-	-	-	-
3-Ara	0,1	-	-	-	-	-
5-Ara	4,2	-	-	-	-	-
Total	7,9 (9)					
t-Xyl	0,2	-	-	-	-	-
Total	0,2 (8)					
t-Man	18,8	39,1	3,1	-	0,9	0,4
2-Man	13,6	18,9	3,8	-	-	3,5
2,6-Man	18,1	10,8	4,2	-	0,3	0,2
Total	50,5 (27)	68,8 (85)	11,1(12)		1,2 (1)	4,1(8)
t-Glc	5,7	1,9	8,2	13,8	8,9	8,9
3-Glc	0,1	0,6	0,2	-	16,7	20,2
4-Glc	24,9	27,9	68,7	74,2	56,6	60,5
6-Glc	2,7	0,9	1,0	0,8	4,2	1,6
2,3-Glc	-	-	-	-	0,3	-
2,4-Glc	-	-	-	-	0,2	-
3,4-Glc	-	-	0,2	-	0,2	-
3,6-Glc	0,7	-	-	-	1,6	0,4
4,6-Glc	4,5	-	10,7	11,2	10,2	4,3
Total	38,6 (53)	31,2 (13)	89,8 (88)	100,0 (99)	98,8 (98)	95,9 (90)

* Valores da análise de açúcares entre parênteses.

A análise por metilação é quantitativa para todos os carboidratos neutros presentes nas frações, existindo também, para a maioria das frações uma boa correspondência entre o somatório das ligações e a composição em carboidratos, como é possível observar pela tabela 6.

No sobrenadante com água quente temos presentes manoproteínas, polissacarídeos compostos por estruturas muito curtas em que os resíduos de manose estão unidos por ligações α -(1 \rightarrow 2) com ramificações em α -(1 \rightarrow 6). Pelo fato de serem polissacarídeos com tamanhos muito pequenos, estas manoproteínas podem ser incluídas na classe de manoproteínas que estabelecem ligações glicosídicas do tipo *O*, através de resíduos de serina ou treonina, às proteínas. A xilose pode estar ligada às manoproteínas, como já está descrito na literatura, no entanto relativamente à arabinose não há informação de como e onde se ligam estes carboidratos na parede celular. As cadeias de glucose têm como principais ligações 24,9 % de (1 \rightarrow 4) e 2,7 % de (1 \rightarrow 6), apresentando-se pouco ramificadas, contendo apenas 0,7 % e 4,5 % de glucose em ligação (1 \rightarrow 3,6) e (1 \rightarrow 4,6), respetivamente e existem poucos terminais de glucose (5,7 %), que podem estar ligados à parte proteica, constituindo assim glicoproteínas. O sobrenadante da extração com 4 M de KOH é constituído maioritariamente por manose em ligações α -(1 \rightarrow 2) e com ramificações α -(1 \rightarrow 6), a cada 6 resíduos de manose.

O sobrenadante do resíduo final é muito rico em glucanas (88 %), em particular cadeias de glucose em ligação (1 \rightarrow 4) (68,8 %) e com mais ramificações (8,2 %, valor estimado com base nas ligações (1 \rightarrow 4), (1 \rightarrow 4,6) e t-Glc) comparativamente ao sobrenadante da extração com 4 M de KOH, em que não foi encontrada glucose ramificada.

Pela análise de metilação verificou-se um aumento da Glc-(1 \rightarrow 4) de 68,7 % no sobrenadante do resíduo final para 74,2 % no Et 37,5 % e um ligeiro aumento na percentagem molar das ramificações de Glc-(1 \rightarrow 4,6) de 10,7 % no sobrenadante do resíduo final para 11,2 % no Et 37,5 %. O grau de polimerização das glucanas presentes no sobrenadante do resíduo final corresponde a 11 resíduos de glucose, valor que está dentro do intervalo de resíduos que constituem o glicogénio (11-12), o que nos leva a supor que o sobrenadante contém glucose em ligação α -(1 \rightarrow 4) [23]. A precipitação com etanol mostrou ser um método eficiente na purificação de glucanas α -(1 \rightarrow 4) solúveis. A maior parte destes polissacarídeos (cerca de 70 % (m/m)) precipitou com uma concentração baixa de etanol

(37,5 %). No entanto com 80 % de etanol foi possível obter outro precipitado ainda com 26% de glucanas e um material solúvel muito pobre em carboidratos. Estes 26 % de glucanas obtidas na segunda precipitação poderão ser glucanas mais ramificadas ou com cadeias mais curtas, logo é necessário um teor mais elevado de etanol para insolubilizar o material que estava solúvel.

Em relação ao resíduo final tratado com clorito/KOH o que se verificou foi um enriquecimento da glucose em ligação (1→4) de 56,6 % para 60,5 % e também da glucose em ligação (1→3) de 16,7 % para 20,2 %. Em relação à percentagem de ramificação, as ramificações em (1→4,6) diminuíram de 10,2 % para 4,3 %. O tratamento com o clorito permitiu extrair as glucanas mais solúveis, ou seja mais ramificadas, tendo aumentado ainda mais as ligações glicosídicas responsáveis pela insolubilidade do resíduo e contribuído para a obtenção de polímeros menos ramificados e consequentemente menos solúveis.

3.2 Hidrólise ácida parcial

Os polímeros possuem velocidades de hidrólise diferentes, que variam de acordo com o tamanho do anel hemiacetálico, a conformação dos monossacarídeos, configuração anomérica e natureza das ligações glicosídicas, presença de grupos funcionais na molécula, intensidade das interações intra e intermoleculares, entre outras. A concentração do ácido, temperatura e tempo são parâmetros importantes a ter em consideração na hidrólise ácida parcial, uma vez que esses cuidados asseguram que um maior número de ligações glicosídicas seja rompido, evitando a degradação dos monossacarídeos obtidos pela hidrólise, a partir do polissacarídeo.

A hidrólise ácida parcial foi promovida com o intuito de remover as ligações glicosídicas mais lábeis, e consequentemente solubilizar o resíduo final. Visto que os polissacarídeos que constituem este resíduo são muitos resistentes e insolúveis foi usada uma concentração de ácido de 250 mM de TFA, a 70 °C durante 30 minutos para que a hidrólise das ligações fosse o mais eficiente possível. O material que não foi solubilizado na primeira hidrólise ácida parcial foi tratado uma segunda vez e assim sucessivamente, tendo sido necessários 7 passos de hidrólise ácida para solubilizar completamente o resíduo final.

Os hidrolisados obtidos foram analisados por cromatografia de exclusão molecular por filtração em Bio-Gel P-30, estando o limite de exclusão compreendido entre os 2,4-40 kDa.

3.2.1 Cromatografia de exclusão molecular em Bio-Gel P-30

A coluna de exclusão molecular foi previamente calibrada com uma solução de glucose e dextrana azul (0,5 mg/mL de dextrana azul e 0,5 mg/mL de glucose). A dextrana foi utilizada para a determinação do volume morto (volume de exclusão) e a glucose foi usada para a determinação do volume interno da coluna (volume de inclusão).

Os compostos obtidos em cada sobrenadante da hidrólise ácida parcial foram fracionados, de acordo com o peso molecular, por cromatografia de exclusão molecular (ponto 2.8.1).

A cromatografia de exclusão molecular separou os compostos segundo o tamanho efetivo das moléculas, isto é, moléculas grandes não penetram no interior das partículas porosas do biogel e movem-se mais rapidamente ao longo da coluna de onde emergem primeiro, enquanto as moléculas pequenas vêm a sua velocidade de deslocamento retardada porque penetram no gel, portanto, emergem da coluna mais tarde.

A figura 15 representa o cromatograma referente a cada um dos 7 ciclos de hidrólise ácida parcial efetuados. Em cada ciclo foram recolhidas 55 frações, que depois de analisada a intensidade de absorvância a 490 nm, e consequentemente a presença de carboidratos, passaram a constituir apenas entre 2 a 4 frações, de acordo com os picos obtidos em cada cromatograma.

Essas 2 a 4 frações foram subdivididas em frações de A a D e feitas, posteriormente, análises de metilação conforme o ponto 2.10.4.

Os hidrolisados obtidos no 1º e 2º ciclos apresentam, possivelmente, ligações glicosídicas mais lábeis em meio ácido (como é o caso das ligações α -(1→4)), logo registou-se uma maior concentração de carboidratos e consequentemente a intensidade de absorvância a 490 nm foi maior, enquanto os hidrolisados relativos aos 3º, 4º, 5º e 6º ciclos da hidrólise ácida parcial foram juntos, uma vez que apresentaram baixos valores de absorvância a 490 nm, constituindo, assim, uma única amostra, que foi aplicada na coluna como o somatório destes 4 ciclos (3º+4º+5º+6º ciclo).

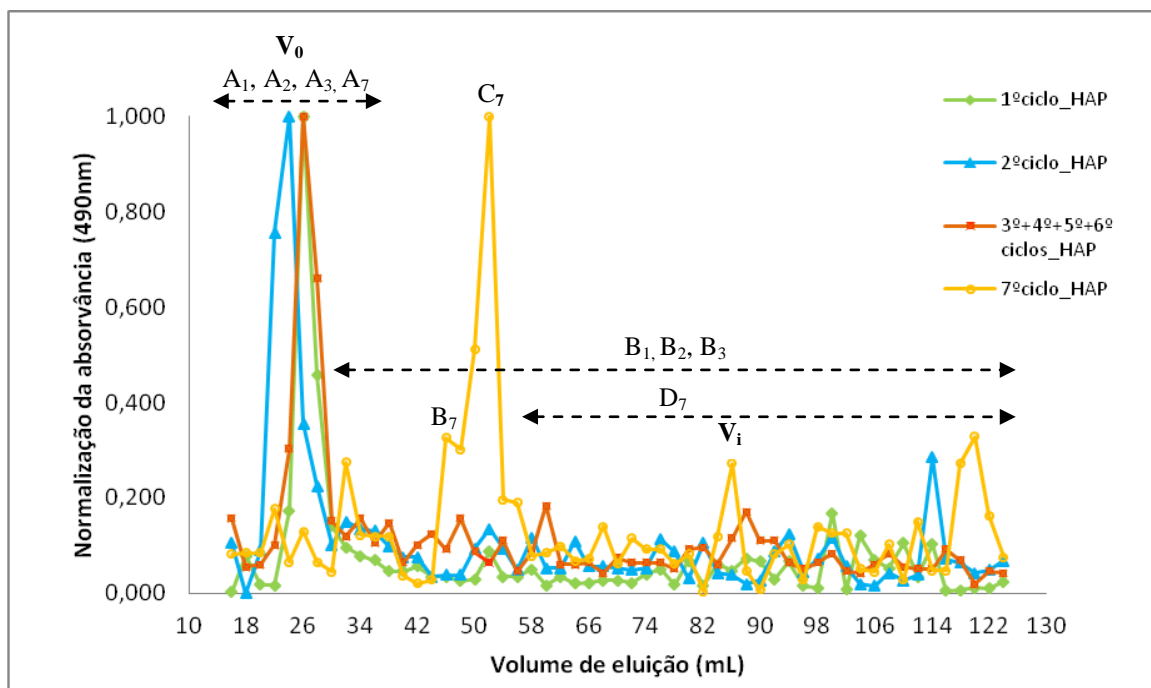


Figura 15 - Cromatograma referente a cada um dos 7 ciclos de hidrólise ácida parcial. As letras de A a D e os correspondentes números associados dizem respeito a sub-frações dos ciclos de 1-7 da hidrólise ácida parcial; v_0 representa o volume morto e v_i o volume interno

Através do cromatograma é possível inferir que existem glucanas solúveis no resíduo final hidrolisado, com pesos moleculares maiores ou iguais a 40 kDa (A_1 , A_2 , A_3 e A_7) e duas frações com um peso molecular entre 2,4 a 40 kDa (B_7 e C_7). A hidrólise ácida parcial promoveu a solubilização completa do resíduo final, sendo que esta solubilização foi maior nos primeiros dois ciclos.

3.2.2 Análise das Ligações Glicosídicas

Após o fracionamento por cromatografia de exclusão molecular dos sobrenadantes obtidos na hidrólise ácida parcial foram analisadas as ligações glicosídicas de cada fração através da análise de metilação (tabela 7).

Tabela 7 - Ligações glicosídicas dos diferentes ciclos da hidrólise ácida parcial e respectivas frações obtidas na cromatografia de exclusão molecular em Bio-Gel P-30

Ligação glicosídica	Fração									
	1º ciclo		2º ciclo		3º+4º+5º+6º ciclo		7º ciclo			
	A ₁	B ₁	A ₂	B ₂	A ₃₋₆	B ₃₋₆	A ₇	B ₇	C ₇	D ₇
t-Ara	19,6	35,3	7,0	20,4	0,2	1,1	3,3	v	v	0,4
3-Ara	v	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5-Ara	2,5	3,6	1,0	6,4	0,4	7,8	3,9	4,8	1,7	4,1
Total	22,1	38,9	8,0	26,8	0,6	8,9	7,2	4,8	1,7	4,5
t-Man	0,7	-	-	-	1,1	0,6	-	-	-	1,6
2-Man	-	-	-	-	0,4	0,7	-	-	-	1,0
2,6-Man	-	-	-	-	0,8	-	-	-	-	-
Total	0,7	-	-	-	2,3	1,3	-	-	-	2,6
t-Glc	11,7	9,9	11,4	17,6	11,5	8,9	6,4	17,3	7,9	6,7
3-Glc	-	-	0,7	-	-	2,5	-	-	-	0,8
4-Glc	52,5	44,0	59,8	37,6	64,9	68,1	85,6	75,2	90,4	68,8
6-Glc	4,3	4,2	11,1	18,0	6,3	3,0	0,8	2,7	-	1,2
3,4-Glc	-	-	0,5	-	0,7	1,0	-	-	-	1,2
3,6-Glc	-	-	-	-	1,2	0,2	-	-	-	-
4,6-Glc	7,0	2,9	8,5	-	12,6	6,1	-	-	-	2,5
Total	75,5	61,0	92,0	73,2	97,2	89,8	92,9	95,2	98,3	81,2

v = Quantidades vestigiais

A glucose está presente em todos os ciclos entre 61 % e 98 %, sendo o mínimo correspondente ao primeiro ciclo e o máximo ao sétimo ciclo. A ligação (1→4) é a maioritária, seguida das ligações (1→6) e (1→3). Existem ainda ramificações principalmente em (1→4,6) nos ciclos iniciais e algumas ramificações em (1→3,4) e (1→3,6).

O que se verifica é que as frações A₁, A₂ e A₃ são as que apresentam mais ramificações, sendo as primeiras a sair da coluna, as frações de baixo peso molecular por sua vez são menos ramificadas e ficam retidas no gel durante mais tempo.

No 1º ciclo, a fração A₁ apresenta uma ramificação a cada 10 resíduos de glucose, enquanto a fração B₁, é menos ramificada, tendo uma ramificação a cada 20 resíduos de glucose, aproximadamente. No 2º ciclo a fração B₂ não tem ramificações, ficando retida na coluna de cromatografia durante mais tempo, comparativamente à fração A₂ que apresenta uma percentagem de ramificação de 9 %. A fração A₃ possui o dobro de ramificações em comparação com a fração de menor peso molecular, B₃. No caso do último ciclo da hidrólise ácida parcial o que se verifica é que as frações iniciais não apresentam ramificações, sendo a fração D₇ a única que é ramificada, possuindo apenas uma ramificação por cada 31 resíduos de glucose. Seria de esperar que as primeiras frações deste ciclo fossem mais ramificadas, uma vez que saíram em primeiro lugar na cromatografia, mas tal facto não se verificou. O grau de polimerização é maior para a fração A₇, apresentando um valor médio de 14 resíduos (estimados pela Glc-(1→4) e t-Glc); a fração B₇ apresenta um valor médio de 5 resíduos de glucose, no entanto as frações C₇ e D₇ apresentam um valor médio superior à fração B₇ de resíduos de glucose (12).

A presença de manose nestes primeiros ciclos é nula ou pouco significativa, sendo mais evidente no 3º ciclo e na última fração correspondente ao 7º ciclo da hidrólise ácida parcial. O próprio resíduo final é pobre em manose, logo seria de esperar que após o tratamento com TFA as frações tivessem pouca ou nenhuma manose.

Pela análise da tabela é possível verificar, também, que a arabinose em ligação (1→5) está presente em todas as frações de cada ciclo da hidrólise ácida parcial, no entanto existe em maior quantidade no 1º e 2º ciclo. A existência de arabinose nunca foi descrita para leveduras. Como esta amostra é dialisada para remoção do tampão fosfato, a arabinose não pode estar na forma livre e o facto de existir uma elevada quantidade de resíduos terminais é um indicador da presença de resíduos de arabinose ligados a material polimérico, nomeadamente a glicoproteínas.

Nas glucanas das frações hidrolisadas, têm como principais ligações glicosídicas as ligações de Glc-(1→4), podendo ir até 90% como é possível verificar nos resultados obtidos no último ciclo da hidrólise ácida parcial. Estes resultados estruturais não estão documentados na literatura, uma vez que o que vem descrito na bibliografia é que principais ligações glicosídicas nas glucanas de leveduras são ligações β -(1→3) e β -(1→6), sendo assim importante um conhecimento mais aprofundado deste tipo de ligações que foram observadas neste trabalho.

3.3. Tratamento enzimático

Na literatura está descrito que a parede das leveduras é constituída maioritariamente por β -glucanas (55-65%) e desses polissacarídeos a maioria corresponde a glucanas β -(1 \rightarrow 3) e uma pequena quantidade diz respeito a glucanas β -(1 \rightarrow 6), não havendo referência à presença de glucanas em ligação β -(1 \rightarrow 4) [20, 21, 27, 31]. Somente alguns artigos referem a existência de α -glucanas com ligações α -(1 \rightarrow 4) e α -(1 \rightarrow 6), correspondentes ao glicogénio [23, 24].

Como a quantidade de glucose em ligação (1 \rightarrow 4) no resíduo final é muito elevada (56,6%), apresentando propriedades de insolubilidade em água e em reagentes alcalinos semelhantes à celulose, este material foi tratado com uma celulase. Esta enzima foi escolhida para comprovar a existência de resíduos de glucose em ligações β -(1 \rightarrow 4) e para demonstrar que existem glucanas com este tipo de ligação glicosídica, hipótese que não foi descrita nem colocada até à data.

A hidrólise do resíduo final com a celulase foi incompleta, apresentando um rendimento da reação de apenas 28 %. No controlo positivo, ou seja, na reação da celulase com papel obteve-se um rendimento de reação de 25 % e como era previsto a reação da amilose com a celulase (controlo negativo) não ocorreu. Estes resultados demonstraram que no resíduo final há efetivamente glucose em ligação β -(1 \rightarrow 4). De forma a conhecer as diferenças em relação à percentagem molar do resíduo final e do mesmo resíduo após o tratamento enzimático com a celulase fez-se uma análise de metilação e os resultados estão evidenciados na tabela 8.

Tabela 8 - Ligações glicosídicas dos carboidratos presentes no resíduo final e no resíduo final tratado com celulase e α -amilase

Ligação glicosídica	Fração (% mol)*		
	Resíduo final	Celulase	α -Amilase
t- Ara	-	-	-
5-Ara	-	0,6	1,5
Total	-	0,6	1,5
t- Man	0,9	1,3	1,7
2-Man	0,3	0,5	-
2,6-Man	-	0,7	0,9
Total	1,2 (1)	2,5	2,6
t- Glc	8,8	13,0	16,3
3-Glc	16,7	21,5	31,0
4-Glc	56,6	39,8	25,2
6-Glc	4,2	7,6	8,7
2,3-Glc	0,3	0,3	0,7
2,4-Glc	0,2	0,2	0,1
3,4-Glc	0,2	1,0	0,4
3,6-Glc	1,6	2,2	3,1
4,6-Glc	10,2	11,9	9,9
Total	98,7 (98)	97,5	95,4

* Valores da análise de açúcares entre parênteses.

O resíduo final hidrolisado com a celulase apresenta uma maior quantidade de manose (2,5 %) em relação ao resíduo final (1,2 %). Uma vez que as concentrações são relativas, como se diminuiu as ligações de glucose (1 \rightarrow 4) as restantes aumentaram. Relativamente à glucose, o que se verifica é um aumento dos terminais de glucose de 4,2%, passando de 8,8 % no resíduo final para 13,0 % no resíduo tratado com a celulase. A percentagem de ramificação do resíduo tratado com esta enzima foi calculada com base nos t-Glc, Glc-(1 \rightarrow 4) e Glc-(1 \rightarrow 4,6), sendo de 4 %. Na hidrólise com a celulase verifica-se que a glucose em ligação (1 \rightarrow 4) diminui de 56,6 % para 39,8 % (diminuição de 16,7 %), o que sugere que dos 56,6 % de 4-Glc presentes no resíduo final, aproximadamente 17 % é Glc- β -(1 \rightarrow 4). Estes resultados indicam a presença de glucanas em ligação β -(1 \rightarrow 4) com ramificações a cada 4 resíduos de glucose em ligação β -(1 \rightarrow 6).

No entanto, como não se reduziu totalmente as ligações (1 \rightarrow 4) com o tratamento enzimático com a celulase foi feito um tratamento ao resíduo final com uma α -amilase. A

α -amilase catalisa a hidrólise das ligações glicosídicas α -(1 \rightarrow 4) e caso se verificasse a redução da percentagem molar de Glc-(1 \rightarrow 4) seria possível confirmar a presença de glucose em ligação α -(1 \rightarrow 4) na levedura cervejeira excedentária.

A hidrólise do resíduo final com a α -amilase foi incompleta, apresentou um rendimento da reação de 46 %, valor bastante superior ao obtido na reação com a celulase. No controlo positivo, ou seja, na reação da α -amilase com a amilose obteve-se um rendimento de reação de 68 % e como era previsto a reação do papel com a α -amilase (controlo negativo) não ocorreu. Como há atividade enzimática sob o resíduo final, estes resultados demonstraram que no resíduo final há efetivamente glucose em ligação α -(1 \rightarrow 4).

Na tabela 8 estão, também, evidenciadas as diferenças em relação à percentagem molar do resíduo final e do mesmo resíduo após o tratamento enzimático com a α -amilase.

O resíduo final hidrolisado com a celulase apresenta uma maior quantidade de manose (2,6 %) em relação ao resíduo final (1,2 %), resultado muito idêntico ao obtido no tratamento com a celulase.

No tratamento com a α -amilase a diminuição da percentagem molar de 4-Glc é ainda mais extensa, sendo possível constatar, pela tabela, uma redução de 56,6 % para 25,2 % dos carboidratos nesta ligação (diminuição de 31,3 %). Este resultado sugere que dos 56,6 % de resíduos de glucose unidos por ligações (1 \rightarrow 4) existentes no resíduo final, 31 % corresponde a Glc- α -(1 \rightarrow 4). No entanto restam ainda 8 % de glucose em ligação (1 \rightarrow 4) que pode apresentar quer a configuração α como β . Como o rendimento da reação do controlo positivo com a α -amilase foi maior (68 %) comparativamente ao tratamento com a celulase (25 %), estes 8 % deverão ser glucose β -(1 \rightarrow 4). Assumindo esta possibilidade é possível concluir que dos 56,6 % de Glc em ligação (1 \rightarrow 4) aproximadamente 31 % dizem respeito a Glc em ligação α -(1 \rightarrow 4) e cerca de 26 % são resíduos de glucose em ligação β -(1 \rightarrow 4).

Em comparação com as glucanas do resíduo final que apresentam uma percentagem de ramificação de 6 %, as ramificações em Glc-(1 \rightarrow 4,6) diminuem, aproximadamente, para 4 % no resíduo tratado com a α -amilase. Uma hipótese que pode justificar este resultado é o facto de esta estrutura (glicogénio insolúvel/resistente) ser muito compacta e bastante ramificada, fazendo com que a hidrólise das ligações α -(1 \rightarrow 4) não seja eficiente.

Uma outra hipótese seria a existência de um estrutura polissacarídea estruturalmente idêntica à celulose, com resíduos de glucose em ligação β -(1 \rightarrow 4), mas ao contrário deste polímero, que se define como uma estrutura linear, sem ramificações, o que se verifica é a possibilidade de estarmos perante a presença de polissacarídeos com uma composição igual à celulose mas com ramificações em β -(1 \rightarrow 6).

A literatura refere a presença de glicogénio nas leveduras, uma α -glucana com ligações α -(1 \rightarrow 4) e ramificações α -(1 \rightarrow 4,6) e que está presente em duas *pools*: 1) no citosol, na forma solúvel e 2) na parede celular, na forma insolúvel, ligado covalentemente às glucanas β -(1 \rightarrow 3) da parede através de ligações β -(1 \rightarrow 3,6). Estas ligações são essenciais para manter os componentes nas suas posições corretas, bem como para prevenir a dissolução/lixiviação de polissacarídeos solúveis em água [23]. Estes resultados permitem efetuar uma extrapolação para os resultados obtidos neste trabalho, no qual as ligações glicosídicas (1 \rightarrow 4) não são apenas α -glucanas (glicogénio) mas também glucanas β -(1 \rightarrow 4), que contribuem em grande parte para a insolubilidade da levedura cervejeira. No entanto, já foi descrito num trabalho realizado na espécie *Pichia pastoris*, da família Saccharomycetaceae, a existência de uma pequena percentagem (aproximadamente 5 %) de ligações de Glc- β -(1 \rightarrow 4) no material insolúvel, tendo sido igualmente detetada, em quantidades vestigiais, a presença destas ligações no material solúvel por ação de uma endo-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucanase [85]. Sendo a *Pichia pastoris* e a *Saccharomyces pastorianus* da mesma família estas poderão partilhar genes que estão envolvidos na síntese de glucanas β -(1 \rightarrow 4), sendo que no caso da levedura cervejeira a quantidade deste polissacarídeo é muito superior. No entanto, não há informação sobre o mecanismo de síntese deste polissacarídeo nem dos genes envolvidos nessa síntese. Uma hipótese que pode eventualmente justificar estes resultados está relacionada com as condições de stresse que a levedura é sujeita ao longo dos ciclos de fermentação, que podem conduzir à expressão destes genes. Estudos comprovam que em condições de stresse, incitados pela fermentação, como é o caso do stresse oxidativo ou alterações do pH no meio, há efetivamente ativação de determinados genes na levedura, como é o caso dos “heat shock genes” e genes envolvidos na síntese da trealose existindo, ainda, um terceiro mecanismo de tolerância ao stresse por identificar [11]. No entanto para confirmar a hipótese de que as condições de stresse podem ativar determinados genes, e neste caso, genes envolvidos na

síntese de celulose, seria necessário estudar o inóculo antes de este ser utilizado na fermentação.

3.4 Análise por Espectroscopia de Infravermelho - FTIR

A Espectroscopia de Infravermelho (FTIR) é uma técnica simples e bastante usada para distinguir as configurações anoméricas α e β em polissacarídeos.

Vários estudos já foram feitos em polissacarídeos para a detecção de α -glucose e β -glucose, sendo que o número de onda característico da glucose em configuração α situa-se entre $870\text{-}840\text{ cm}^{-1}$ e a β corresponde a 890 cm^{-1} [86-88].

Neste trabalho foi analisado o resíduo final obtida na extração sequencial e, também, o resíduo final tratado com α -amilase e com uma celulase. Os espectros obtidos pelo FTIR do resíduo tratado com a α -amilase permitem verificar a presença de uma banda a 890 cm^{-1} , permitindo inferir a presença de glucose em ligação β -(1 \rightarrow 4), confirmando a existência de glucanas β -(1 \rightarrow 4) na levedura. Por sua vez, o resíduo tratado com a celulase apresenta uma banda a $870\text{-}840\text{ cm}^{-1}$, valor que está dentro do intervalo característico da glucose em ligação α .

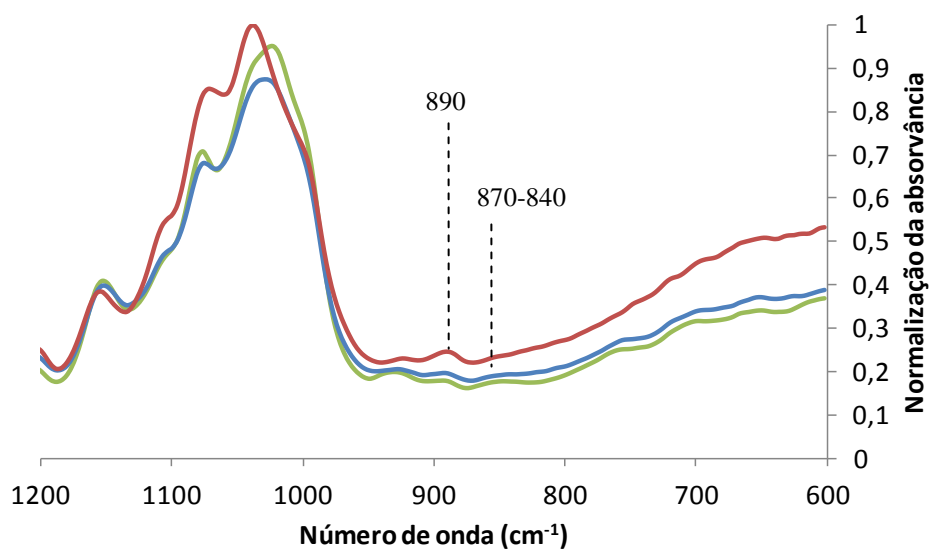


Figura 16 - Espectros de FTIR obtidos das amostras: resíduo final (verde), resíduo final tratado com α -amilase (vermelho) e resíduo final tratado com celulase (azul).

Apesar de ser possível perceber a existência das bandas características das configurações anoméricas em cada um dos resíduos tratados enzimaticamente e haver, efetivamente, uma analogia com o que está descrito na literatura, torna-se difícil de aferir a

banda a $870\text{-}840\text{ cm}^{-1}$ pois a intensidade deste pico é muito pequena (figura 16), assim sendo fez-se uma análise quimiométrica, através da análise dos componentes principais (PCA). Esta ferramenta de análise permitiu visualizar diferenças nas duas amostras processadas no FTIR (resíduo final + α -amilase e resíduo final + celulase).

Na figura 17 está representado o gráfico de coordenadas fatoriais, PC1 vs. PC2, que contam com 97,8 % da variabilidade total.

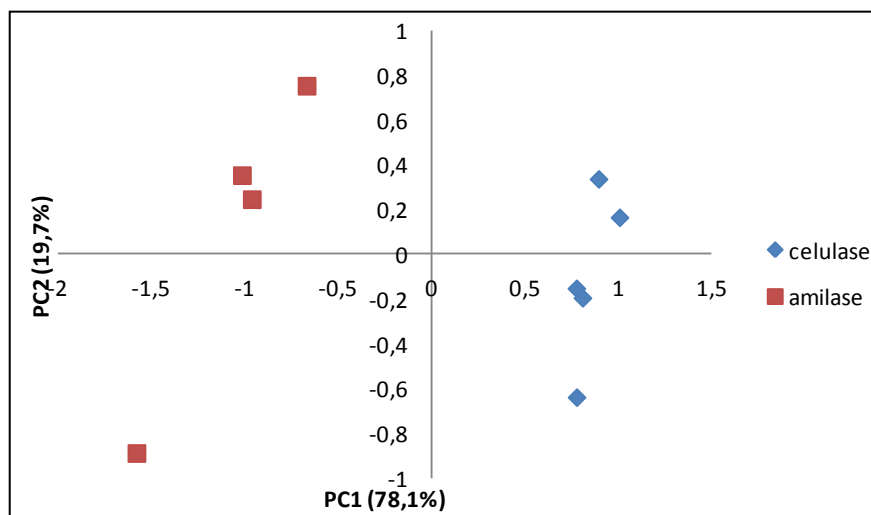


Figura 17 - Coordenadas fatoriais, PC1 vs. PC2, da região de FTIR $1200\text{-}600\text{ cm}^{-1}$.

Pela análise da figura 17 é possível verificar uma clara separação entre o resíduo tratado com celulase e α -amilase, sendo que no PC1 positivo temos presente o resíduo final hidrolisado pela celulase e no PC1 negativo está presente o resíduo hidrolisado com a α -amilase.

Na figura 18 estão representadas as contribuições fatoriais (“loadings”) do PC1 da região de FTIR $1200\text{-}600\text{ cm}^{-1}$.

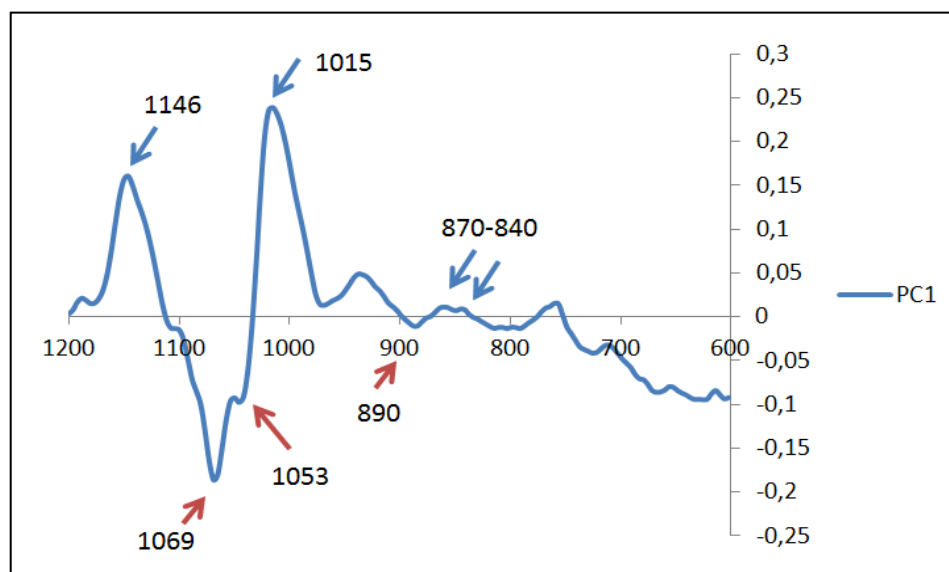


Figura 18 - Contribuições fatoriais (“loadings”) de PC1 e PC2 da região de FTIR 1200-600 cm^{-1} . As setas a vermelho indicam picos correspondentes a números de onda caraterísticos de β -glucanas (tratamento com α -amilase) e as setas a azul são indicadores de números de onda caraterísticos de α -glucanas (tratamento com celulase).

De acordo com a literatura a presença de α -(1 \rightarrow 4) glucanas pode também ser identificada na zona de *fingerprint* através dos números de onda 1150 e 998 cm^{-1} e as β -(1 \rightarrow 4) glucanas pela existência de dois picos no número de onda 1050 e 1041 cm^{-1} [86]. Pela figura 18 é possível visualizar, de acordo com os *loadings*, a existência de dois picos a 1146 e 1015 cm^{-1} no PC1 positivo, próximos dos números de onda de α -(1 \rightarrow 4) glucanas e dois picos no PC1 negativo caraterísticos das β -(1 \rightarrow 4) glucanas aos 1069 e 1053 cm^{-1} próximos dos números de onda descritos para estas glucanas, estando também presentes os picos 870-840 e 890 cm^{-1} correspondentes ao carbono anomérico no PC1 positivo e negativo, respetivamente. Com base nestes resultados é possível concluir que o resíduo final é efetivamente composto por uma mistura de α e β glucanas.

3.5 Relação entre a estrutura dos polissacarídeos da levedura cervejeira excedentária e possíveis atividades biológicas

Neste trabalho fez-se uma análise e caracterização estrutural dos polissacarídeos da levedura cervejeira excedentária. A partir da articulação entre o conhecimento obtido e a informação disponível na literatura relativa às atividades biológicas de polissacarídeos de levedura, foi possível conjecturar possíveis atividades biológicas inerentes aos polissacarídeos extraídos neste trabalho.

Como foi provado neste estudo, as glucanas da levedura cervejeira apresentam ligações β -(1 \rightarrow 4) que não são degradadas pelo nosso organismo, podendo ser utilizadas como fibra dietética insolúvel, contribuindo para o crescimento de bactérias ácido-láticas, microrganismos que colonizam o trato intestinal e que desempenham funções importantes para a saúde e bem-estar do hospedeiro. Além de poderem ser usados com fibra dietética insolúvel, algumas destas glucanas são solúveis após extração com soluções alcalinas fortes e outros tratamentos, como foi o caso da hidrólise ácida parcial, que promoveram a solubilidade das glucanas presentes no resíduo final. Assim sendo, estes polissacarídeos podem atuar igualmente como fibra dietética solúvel, contribuindo para a redução dos níveis de colesterol, prevenção de doenças cardiovasculares e fornecimento de alimento para a flora intestinal. As propriedades destes compostos sugerem que poderão ser usados como ingredientes funcionais em diversos alimentos de consumo diário, promovendo a produção de alimentos benéficos para a saúde [27, 43].

A levedura cervejeira também é constituída por glucanas β -(1 \rightarrow 3), aproximadamente 17 % no resíduo final, cujas atividades biológicas estão já bastante descritas, nomeadamente atividades antioxidantes e atividades imunoestimuladoras, sendo capazes de interagir e estabelecer ligações com outros compostos, como é o caso de recetores biológicos desencadeando uma série de efeitos relacionados com a resposta imunitária.

Relativamente às manoproteínas extraídas, estas parecem pertencer à classe de manoproteínas com ligações glicosídicas do tipo *O*, uma vez que são cadeias muito ramificadas de manopiranose em ligação (1 \rightarrow 2) e (1 \rightarrow 2,6). Estes polissacarídeos poderão desempenhar funções antitumorais e antioxidantes, já descritos em alguns estudos, e também atividades bioemulsionantes, devido à presença de uma estrutura anfipática que resulta de ligações covalentes entre os polímeros hidrofílicos de manose e a fração proteica

[52, 61, 63]. Desta forma poderão ter aplicações em diversos produtos quer na indústria alimentar, em bebidas e outros produtos alimentares, como no setor da cosmética na formulação de cremes, géis, entre outros.

4.CONCLUSÕES E TRABALHO FUTURO

A valorização de subprodutos é um tema que assume um grau de importância crescente na sociedade atual, tendo-se vindo a verificar um interesse científico e económico no estudo destes resíduos agro-industriais. A indústria cervejeira produz grandes quantidades de resíduos, cerca de 141,1 kg de subprodutos por cada 1000 L de cerveja produzida e no caso específico da levedura excedentária, são obtidas entre 1,7 e 2,3 kg/1000 L de cerveja, sendo basicamente empregue na formulação de rações animais.

A levedura excedentária possui, no entanto, potencialidades que não são devidamente aproveitadas nomeadamente as que podem resultar dos polissacarídeos que fazem parte da sua constituição. Estes polissacarídeos, em particular as glucanas e as manoproteínas têm sido descritos como tendo atividade imunoestimuladora, atividade antioxidante, atividade anti-tumoral, atividade antimicrobiana e efeitos como bioemulsionantes e prebióticos, podendo ser aplicadas em diversos setores agro-alimentares no desenvolvimento de novos produtos de valor acrescentado.

Os polissacarídeos da levedura cervejeira excedentária mostraram ser basicamente material insolúvel, tendo sido necessário o uso de soluções alcalinas fortes para promover a sua solubilização. A partir da análise de carboidratos e de metilação dos polissacarídeos extraídos foi inferido que este material era rico em β -glucanas, α -glucanas, manoproteínas, e ainda alguns carboidratos em menor quantidade, como xilose, galactose, ácidos urónicos e arabinose.

O resíduo final tratado com o clorito constituiu uma tentativa para melhorar e promover a solubilização dos polissacarídeos, no entanto, este objetivo não foi alcançado. O clorito promoveu a remoção de material não polissacarídico, no entanto não foi eficaz na extração dos polissacarídeos, que permaneceram insolúveis.

A hidrólise ácida parcial do resíduo final foi outro método a que se recorreu para promover a solubilização das glucanas insolúveis e, conseqüentemente, promover a sua utilização como compostos bioativos. Os resultados obtidos demonstram que é possível obter glucanas solúveis em água com pesos moleculares ≥ 40 kDa e duas frações com um peso molecular entre 2,4 a 40 kDa.

Em relação às ligações estabelecidas entre os carboidratos, as principais ligações glicosídicas encontradas foram Glc-(1 \rightarrow 4), Glc-(1 \rightarrow 3) e Glc-(1 \rightarrow 6) e ramificações em Glc-(1 \rightarrow 4,6) e Glc-(1 \rightarrow 3,6). No resíduo final a quantidade de glucose em ligação (1 \rightarrow 4) é muito elevada (56,6 %), apresentando propriedades de insolubilidade em água e em

reagentes alcalinos semelhantes à celulose. Este material foi tratado com celulase e α -amilase tendo-se registado atividade enzimática nas duas enzimas o que nos leva a concluir que as ligações de Glc-(1 \rightarrow 4) apresentam os dois tipos de configuração anomérica: α e β . A existência de resíduos de glucose em ligações β -(1 \rightarrow 4) em leveduras cervejeiras constitui um resultado que não foi descrito nem colocado até à data.

Estes resultados foram corroborados pela análise de FTIR do resíduo tratado com a celulase e a α -amilase. Através da deteção no espectro de infravermelho médio do comprimento de onda característico de cada uma das configurações, foi possível distinguir α -glucanas de β -glucanas, a partir do respetivo comprimento de onda. No caso da conformação α o número de onda corresponde foi aos 870-840 cm^{-1} e na conformação β o número de onda característico localiza-se, aproximadamente, aos 890 cm^{-1} . A análise quimiométrica dos espectros obtidos por FTIR permitiu encontrar diferenças significativas entre as amostras em estudo, constituindo mais uma informação que confirma a existência de α e β glucanas no resíduo. Segundo a literatura, as glucanas com graus de polimerização superiores a 100, ou seja, com pesos moleculares ≥ 16 kDa, são polímeros insolúveis [30]. Neste trabalho foram obtidas glucanas de massa molecular ≥ 40 kDa solúveis em água e contendo ligações de glucose em ligação (1 \rightarrow 4,6), mostrando que estas frações possam conter polissacarídeos provenientes do glicogénio.

Este estudo contribuiu para uma melhor compreensão ao nível estrutural dos polissacarídeos da levedura cervejeira, e abriu caminho a uma nova visão e conhecimento destes polímeros na medida em que foram encontrados polissacarídeos em ligações glicosídicas não referenciadas na literatura, mais precisamente os resíduos de glucose em ligação β -(1 \rightarrow 4). Este trabalho permitiu verificar que os polissacarídeos mais abundantes da levedura excedentária cervejeira são polímeros com características estruturais semelhantes à celulose, justificando assim a sua resistência à extração com soluções alcalinas, à hidrólise ácida parcial e à oxidação com clorito, assim como a sua insolubilidade em soluções aquosas.

A partir do conhecimento estrutural dos polissacarídeos da levedura cervejeira excedentária é possível inferir sobre as possíveis aplicações biológicas destes polímeros, podendo ser usados como fibra dietética, bioemulsionantes e imunoestimuladores.

Das tentativas de solubilização das glucanas, a hidrólise ácida parcial parece ser um método eficiente para a solubilização deste material insolúvel, sendo que o hidrolisado ácido de levedura é solúvel e poderá ter potencialidades a nível industrial.

Pelos resultados obtidos neste trabalho, a metodologia que se pode propor para a extração dos polissacarídeos da levedura cervejeira excedentária engloba a combinação da extração com soluções alcalinas, nomeadamente com soluções de 4 M de KOH para promover a extração de manoproteínas, com a hidrólise ácida parcial, para solubilização das glucanas.

Apesar do presente trabalho ter permitido o isolamento dos polissacarídeos da levedura cervejeira, bem como informação sobre as suas características estruturais, existem ainda várias áreas que poderão vir a ser exploradas numa investigação futura:

1. A natureza das ligações estabelecidas entre a xilose, galactose e os polissacarídeos maioritários (β -glucanas e manoproteínas).
2. Determinação do tipo de complexos existentes entre as glucanas α -(1 \rightarrow 4) e β -(1 \rightarrow 4) presentes na levedura cervejeira.
3. A possível existência de polissacarídeos semelhantes à celulose na levedura cervejeira e quais os mecanismos que estão envolvidos e conduzem à expressão celular e síntese destes polímeros.
4. A influência de fatores de stresse na expressão de genes envolvidos na síntese de celulose em leveduras cervejeiras.

Esta informação poderá ser útil para complementar o conhecimento adquirido em relação à estrutura e composição destes polissacarídeos e posteriormente melhorar e promover métodos mais rentáveis e eficientes de extração e solubilização destes polissacarídeos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Insights, B., *Innovations in Beer - Growth opportunities in emerging markets, new flavors and innovative product formats*. 2010. 38-52.
2. Berkhout, B., Boersma, N., Kruis, G., Poel, P., Wit, W.d., *The Contribution made by Beer to the Portuguese Economy*. 2009: Amsterdam.
3. Ferreira, I.M.P.L.V., Pinho, O., Vieira, E., Tavarela, J.G., *Brewer's Saccharomyces yeast biomass: characteristics and potential applications*. Trends in Food Science & Technology 2010. **21**: 77-84.
4. Unicer Bebidas, S. *O processo de produção da cerveja*. 2011 Acedido em 30/11/2011]; Available from: <http://www.unicer.pt/gca/index.php?&id=407&sw=1366>.
5. Kunze, W., *Metabolism of the yeast*, in *Technology Brewing and Malting*, V. Berlin, Editor. 2004. 369-384.
6. Commission, E., *Food, Drink and Milk Industries*. 2006, Joint Research Centre. 105-205.
7. Amory, D.E., Rouxhet, P.G., *Surface properties of Saccharomyces cerevisiae and Saccharomyces carlsbergensis: chemical composition, electrostatic charge and hydrophobicity*. Biochimica et Biophysica, 1988. **938**(1): 61-70.
8. Dengis, P.B., Nélisten, L.R., Rouxhet, P.G., *Mechanisms of Yeast Flocculation: Comparison of Top and Bottom-Fermenting Strains*. Applied and Environmental Microbiology, 1995. **61**(2): 718-728.
9. Fillaudeau, L., Blanpain-Avet, P., Daufin, G., *Water, wastewater and waste management in brewing industries*. Journal of Cleaner Production 2006. **14**(5): 463-471.
10. Brito, A.G., Peixoto, J., Oliveira, J.M., Oliveira, J.A., Costa, C., Nogueira, R., Rodrigues, A.C., *Brewery and winery wastewater treatment: some focal points of design and operation*, Springer, Editor. 2007: Braga.
11. James, T.C., Campbell, S., Donnelly, D., Bond, U., *Transcription profile of brewery yeast under fermentation conditions*. Journal of Applied Microbiology 2003. **94**(3): 432-448.
12. PricewaterhouseCoopers & Associados - Sociedade de Revisores Oficiais de Contas, L., *Relatório de Sustentabilidade UNICER*. 2007.
13. Blagočić, B., Rupčić, J., Mesarić, M., Georgiú, K., Marić, V., *Lipid Composition of Brewer's Yeast*. Food Technology and Biotechnology 2001. **39**(3): 175-181.

14. Cefalu, W.T., Hu, F.B., *Role of Chromium in Human Health and in Diabetes*. Diabetes Care, 2004. **27**(11): 2741-2751.
15. Klis, F.M., Mol, P., Hellingwerf, K., Brul, S., *Dynamics of cell wall structure in Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiology Reviews, 2002. **26**(3): 239-256.
16. Lodolo, E.J., Kock, J.L.F., Axcell, B.C., Brooks, M., *The yeast Saccharomyces cerevisiae - the main character in beer brewing*. FEMS Yeast Research, 2008. **8** (7): 1018–1036.
17. Tamai, Y., Momma, T., Yoshimoto, H., Kaneko, Y., *Co-existence of Two Types of Chromosome in the Bottom Fermenting Yeast, Saccharomyces pastorianus*. Yeast 1998. **14**(10): 923–933.
18. Alsteens, D., Dupres, V., Evoy, K.M., Wildling, L., Gruber, H.J., Dufrêne, Y.F., *Structure, cell wall elasticity and polysaccharide properties of living yeast cells, as probed by AFM*. Nanotechnology 2008. **19**(38): 1-9.
19. Martini, A.V., Kurtzman, C.P., *Deoxyribonucleic Acid Relatedness among Species of the Genus Saccharomyces Sensu Stricto*. International Journal of Systematic Bacteriology, 1985 **35**(4): 508-511.
20. Klis, F.M., Boorsma, A., Groot, P.W.J.D., *Cell wall construction in Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 2006. **23**(3): 185–202.
21. Lipke, P.N., Ovalle, R., *Cell Wall Architecture in Yeast: New Structure and New Challenges*. Journal of Bacteriology, 1998. **180**(15): 3735-3740.
22. Liu, X.-Y., Wang, Q., Cui, S.W., Liu, H.-Z., *A new isolation method of β -D-glucans from spent yeast Saccharomyces cerevisiae*. Food Hydrocolloids, 2008. **22**(2): 239-247.
23. Arvindekar, A.U., Patil, N.B., *Glycogen - a covalently linked component of the cell wall in Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 2002. **19**(2): 131-139.
24. Deshpande, P.S., Sankh, S.N., Arvindekar, A.U., *Study of Two Pools of Glycogen in Saccharomyces cerevisiae and their Role in Fermentation Performance*. Journal of the Institute of Brewing, 2011. **117**(1): 113–119.
25. Aklujkar, P.P., Sankh, S.N., Arvindekar, A.U., *A Simplified Method for the Isolation and Estimation of Cell Wall Bound Glycogen in Saccharomyces cerevisiae*. Journal of the Institute of Brewing, 2008. **114**(3): 205–208.
26. VitaminPros, I. 2005 Acedido em 19/12/2011]; Available from: <http://www.vitaminpros.com/beta-1-3-glucan.htm>.

27. Laroche, C., Michaud, P., *New Developments and Prospective Applications for β -(1,3) Glucans*. Recent Patents on Biotechnology, 2007. **1**(1): 59-73.
28. Zechner-Krpan, V., -Tominac, V.P., Krbavčić, I.P., Grba, S., Berković, K., *Potential Application of Yeast β -Glucans in Food Industry*. Agriculturae Conspectus Scientificus, 2009. **74**(4): 277-282.
29. Chen, J., Seviour, R., *Medicinal importance of fungal β -(1/3), (1/6)-glucans*. Mycological Research III, 2007. **111**(6): 635-652.
30. Mantovani, M.S., Bellini, M.F., Angeli, J.P.F., Oliveira, R.J., Silva, A.F., Ribeiro, L.R., *β -Glucans in promoting health: Prevention against mutation and cancer*. Mutation Research, 2008. **658**(3): 154–161.
31. Lesage, G., Bussey, H., *Cell Wall Assembly in *Saccharomyces cerevisiae**. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2006. **70**(2): 317–343.
32. Cid, V.J., Durán, A., Rey, F.D., Snyder, M.P., Nombela, C., Sánchez, M., *Molecular Basis of Cell Integrity and Morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae**. Microbiological Reviews 1995. **59**(3): 345–386.
33. Aimanianda, V., Clavaud, C., Simenel, C., Fontaine, T., Delepierre, M., Latgé, J.-P., *Cell Wall β -(1,6) - Glucan of *Saccharomyces cerevisiae* - Structural Characterization and In Situ Synthesis*. Journal of Biological Chemistry, 2009. **284**(20): 13401–13412.
34. Magnelli, P., Cipollo, J.F., Abeijon, C., *A Refined Method for the Determination of *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall Composition and β -1,6-Glucan Fine Structure*. Analytical Biochemistry, 2002. **301**(1): 136–150.
35. Zhang, M., Cui, S.W., Cheung, P.C.K., Wang, Q., *Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity*. Trends in Food Science & Technology 2007. **18**(1): 4-19.
36. Ha, C.H., Lim, K.H., Kim, Y.T., Lim, S.T., Kim, C.W., Chang, H.I., *Analysis of alkali-soluble glucan produced by *Saccharomyces cerevisiae* wild-type and mutants*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002. **58**(3): 370-377.
37. Bohn, J.A., BeMiller, J.N., *(1-3)- β -D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships*. Carbohydrate Polymers, 1995. **28**(1): 3-14.
38. Jaehrig, S.C., Rohn, S., Kroh, L.W., Fleischer, L.-G., Kurz, T., *In Vitro Potential Antioxidant Activity of (1-3),(1-6)- β -D-Glucan and Protein Fractions from *Saccharomyces**

- cerevisiae Cell Walls*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007. **55**(12): 4710-4716.
39. Bioglycogen. Acedido em 15/06/2012]; Available from: <http://www.glico.co.jp/en/material/bioglycogen/index.htm>.
40. Gunja-Smith, Z., Patil, N.B., Smith, E.E., *Two Pools of Glycogen in Saccharomyces*. Journal of Bacteriology 1977. **130**(2): 818-825.
41. Kwiatkowski, S., Thielen, U., Glenney, P., Moran, C., *A Study of Saccharomyces cerevisiae Cell Wall Glucans*. Journal of the Institute of Brewing, 2009. **115**(2): 151–158.
42. Meléndez, R., Meléndez-Hevia, E., Cascante, M., *How did glycogen structure evolve to satisfy the requirement for rapid mobilization of glucose? A problem of physical constraints in structure building*. Journal of Molecular Evolution, 1997. **45**(4): 446-455.
43. Tominac, V.P., Zechner-Krpan, V., Grba, S., Srećec, S., Krbavčić, I.P., Vidović, L., *Biological Effects of Yeast β -Glucans*. Agriculturae Conspectus Scientificus 2010. **75**(4): 149-158.
44. Kogan, G., Kocher, A., *Role of yeast cell wall polysaccharides in pig nutrition and health protection*. Livestock Science, 2007. **109**(1-3): 161-165.
45. Chlubnová, I., Sylla, B., Nugier-Chauvin, C., Daniellou, R., Legentil, L., Kralová, B., Ferrières, V., *Natural glycans and glycoconjugates as immunomodulating agents*. Natural Product Reports, 2011. **28**(5): 937–952.
46. Descroix, K., Větvicka, V., Laurent, I., Jamois, F., Yvin, J.-C., Ferrières, V., *New oligo- β -(1,3)-glucan derivatives as immunostimulating agents*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2010. **18**(1): 348-357.
47. Saraswat-Ohri, S., Vashishta, A., Větvicka, V., Descroix, K., Jamois, F., Yvin, J., Ferrières, V., *Biological properties of (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan-based synthetic oligosaccharides*. Journal of Medicinal Food, 2011. **14**(4): 369-376.
48. Satrapai, S., Suphantharika, M., *Influence of spent brewer's yeast β -glucan on gelatinization and retrogradation of rice starch*. Carbohydrate Polymers 2007. **67**(4): 500-510.
49. Liang, J., Melican, D., Cafro, L., Palace, G., Fisette, L., Armstrong, R., Patchen, M.L., *Enhanced clearance of a multiple antibiotic resistant Staphylococcus aureus in rats treated with PGG-glucan is associated with increased leukocyte counts and increased*

- neutrophil oxidative burst activity*. International Journal of Immunopharmacology 1998. **20**(1): 595-614.
50. Kogan, G., Staško, A., Bauerová, K., Polovka, M., Šoltés, L., Brezová, V., Navarová, J., Mihalová, D., *Antioxidant properties of yeast (1→3)-β-D-glucan studied by electron paramagnetic resonance spectroscopy and its activity in the adjuvant arthritis*. Carbohydrate Polymers, 2005. **61**(1): 18-28.
51. Nguyen, T.H., Fleet, G.H., Rogers, P.L., *Composition of the cell walls of several yeast species*. Applied Microbiology and Biotechnology, 1998. **50**: 206-212.
52. Križková, L., Ďuračková, Z., Šandula, J., Sasinková, V., Jánošík, J., *Antioxidative and antimutagenic activity of yeast cell wall mannans in vitro*. Mutation Research 2001. **497**(1-2): 213-222.
53. Coelho, E., Rocha, S.M., Coimbra, M.A., *Foamability and Foam Stability of Molecular Reconstituted Model Sparkling Wines*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011. **59**(16): 8770-8778.
54. Fleuri, L.F., Sato, H.H., *Produção, Purificação, Clonagem e Aplicação de Enzimas Líticas*. Química Nova, 2005. **28**(5): 871-879.
55. Dikit, P., Methacanon, P., Visessanguan, W., H-kittikun, A., Maneerat, S., *Characterization of an unexpected bioemulsifier from spent yeast obtained from Thai traditional liquor distillation*. International Journal of Biological Macromolecules 2010. **47**(4): 465–470.
56. Barriga, J.A.T., Cooper, D.G., Idziak, E.S., Cameron, D.R., *Components of the bioemulsifier from S. cerevisiae*. Enzyme and Microbial Technology, 1999. **25**(1-2): 96–102.
57. Jigami, Y., Odani, T., *Mannosylphosphate transfer to yeast mannan*. Biochimica et Biophysica Acta 1999. **1426**(2): 335-345.
58. Cameron, D.R., Cooper, D.G., Neufeld, R.J., *The Mannoprotein of Saccharomyces cerevisiae is an Effective Bioemulsifier*. Applied and Environmental Microbiology 1988. **54**(6): 1420-1425.
59. Lehle, L., Cohen, R.E., Balloug, C.E., *Carbohydrate Structure of Yeast Invertase*. The Journal of Biological Chemistry 1979. **254**(23): 12209-12218.
60. Pastor, F.I.J., Herrero, E., Sentandreu, R., *Metabolism of Saccharomyces cerevisiae envelope mannoproteins*. Archives of Microbiology, 1982. **132**(2): 144-148.

61. Liu, H.-Z., Wang, Q., He, Y., *Immunoactivities and antineoplastic activities of Saccharomyces cerevisiae mannoprotein*. Carbohydrate Polymers 2011. **83**(4): 1690–1695.
62. Ferracini-Santos, L., Sato, H.H., *Isolamento de polímeros da parede celular de Saccharomyces cerevisiae e avaliação da atividade antioxidante da manana-proteína isolada*. Química Nova, 2009. **32**(2): 322-326.
63. Dikit, P., Maneerat, S., Musikasang, H., H-kittikun, A., *Emulsifier properties of the mannoprotein extract from yeast isolated from sugar palm wine*. ScienceAsia 2010. **36**(4): 312–318.
64. Conde, R., Cueva, R., Larriba, G., *Rsc14-controlled expression of MNN6, MNN4 and MNN1 regulates mannosylphosphorylation of Saccharomyces cerevisiae cell wall mannoproteins*. Federation of European Microbiological Societies Yeast Research 2007. **7**(8): 1248–1255.
65. Lukondeh, T., Ashbolt, N.J., Rogers, P.L., *Evaluation of Kluyveromyces marxianus FII 510700 grown on a lactose-based medium as a source of a natural bioemulsifier*. The Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2003. **30**(12): 715–720.
66. Zhang, S., Chen, R., Wu, H., Wang, C., *Ginsenoside extraction from Panax quinquefolium L. (American ginseng) root by using ultrahigh pressure*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2006. **41**(1): 57–63.
67. Zechner-Krpan, V., Petravić-Tominac, V., Gospodarić, I., Sajli, L., Daković, S., Filipović-Grčić, J., *Characterization of β -Glucans Isolated from Brewer's Yeast and Dried by Different Methods*. Food Technology and Biotechnology, 2010. **48**(2): 189–197.
68. Fleet, G.H., Manners, D.J., *Isolation and Composition of an Alkali-soluble Glucan from the Cell Walls of Saccharomyces cerevisiae*. Journal of General Microbiology 1976. **94**(1): 180-192.
69. Ohno, N., Uchiyama, M., Tsuzuki, A., Tokunaka, K., Miura, N.N., Adachi, Y., Aizawa, M.W., Tamura, H., Tanaka, S., Yadomae, T., *Solubilization of yeast cell-wall β -(1-3)-D-glucan by sodium hypochlorite oxidation and dimethyl sulfoxide extraction*. Carbohydrate Research 1999. **316**(1-4): 161–172.
70. Freimund, S., Sauter, M., Kappeli, O., Dutler, H., *A new non-degrading isolation process for 1,3- β -D-glucan of high purity from baker's yeast Saccharomyces cerevisiae*. Carbohydrate Polymers 2003. **54**(2): 159–171.

71. Dallies, N., François, J., Paquet, V., *A New Method for Quantitative Determination of Polysaccharides in the Yeast Cell Wall. Application to the Cell Wall Defective Mutants of Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 1998. **14**(14): 1297–1306.
72. Wang, Y., Yao, S., Wu, T., *Combination of induced autolysis and sodium hypochlorite oxidation for the production of Saccharomyces cerevisiae (1-3)- β -D-glucan*. World Journal of Microbiology & Biotechnology 2003. **19**(9): 947–952.
73. Ruiz, R.P., Wrolstad, R., Acree, T.E., An, H., Decker, E.A., Penner, M.H., Reid, D.S., Schwartz, S.J., Shoemaker, C.F., Sporns, P., *Measuring Moisture Using a Convection Oven in Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. 2001, John Wiley & Sons, Inc.
74. Ruiz, R.P., Wrolstad, R., Acree, T.E., An, H., Decker, E.A., Penner, M.H., Reid, D.S., Schwartz, S.J., Shoemaker, C.F., Sporns, P., *The Bicinchoninic Acid (BCA) for Determination of Total Protein in Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. 2001, John Wiley & Sons, Inc.
75. Selvendran, R.R., O'Neill, M.A., *Isolation and Analysis of Cell Walls from Plant Material*, in *Methods of Biochemical Analysis*. 2006, John Wiley & Sons, Inc. 25-153.
76. Selvendran, R.R., Stevens, B.J.H., O'Neill, M.A., *Developments in the isolation and analysis of cell walls from edible plants*. Society for Experimental Biology, 1985. **28**(1): 39-78.
77. O'Neill, M.A., Selvendran, R.R., *Glycoproteins from the Cell Wall of Phaseolus coccineus*. Biochemical Journal 1980. **187**(1): 53-63.
78. Nunes, F.M., Reis, A., Silva, A.M.S., Domingues, M.R.M., Coimbra, M.A., *Rhamnoarabinosyl and rhamnoarabinoarabinosyl side chains as structural features of coffee arabinogalactans*. Phytochemistry 2008. **69**(7): 1573–1585.
79. Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., *Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances*. Analytical Chemistry, 1956. **28**(3): 350-356.
80. Selvendran, R.R., March, J.F., Ring, S.G., *Determination of aldoses and uronic acid content of vegetable fiber*. Analytical Biochemistry, 1979. **96**(2): 282-292.
81. Blakeney, A.B., Harris, P.J., Henry, R.J., Stone, B.A., *A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis*. Carbohydrate Research, 1983. **113**(2): 291-299.

82. Tucker, M.P., Nguyen, Q.A., Eddy, F.P., Kadam, K.L., Gedvilas, L.M., Webb, J.D., *Fourier Transform Infrared Quantitative Analysis of Sugars and Lignin in Pretreated Softwood Solid Residues*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2001. **91–93**(1-9): 51-61.
83. Schmitt, J., Flemming, H.-C., *FTIR-spectroscopy in microbial and material analysis*. International Biodeterioration & Biodegradation 1998. **41**(1): 1-11.
84. Baker, R.W.R., *Studies on the Reaction between Sodium Hypochlorite and Proteins*. Biochemical Journal, 1947. **41**(3): 337-342.
85. Cocuron, J.-C., Lerouxel, O., Drakakaki, G., Alonso, A.P., Liepman, A.H., Keegstra, K., Raikhel, N., Wilkerson, C.G., *A gene from the cellulose synthase-like C family encodes a β -1,4 glucan synthase*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007. **104**(20): 8550–8555.
86. Oliveira, H., Barros, A.S., Delgadillo, I., Coimbra, M.A., Santos, C., *Effects of fungus inoculation and salt stress on physiology and biochemistry of in vitro grapevines: Emphasis on sugar composition changes by FT-IR analyses*. Environmental and Experimental Botany, 2009. **65**(1): 1-10.
87. Kacuráková, M., Wilson, R.H., *Developments in mid-infrared FT-IR spectroscopy of selected carbohydrates*. Carbohydrate Polymers, 2001. **44**(4): 291–303.
88. Galichet, A., Sockalingum, G.D., Belarbi, A., Manfait, M., *FTIR spectroscopic analysis of Saccharomyces cerevisiae cell walls: study of an anomalous strain exhibiting a pink-colored cell phenotype*. FEMS Microbiology Letters 2001. **197**(2): 179-186.